

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 549**

51 Int. Cl.:

C07K 14/775 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2009 PCT/US2009/059457**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO10040112**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 09818601 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2352830**

54 Título: **Tratamiento de las enfermedades relacionadas con la apolipoproteína A1 por inhibición de transcrito antisentido natural a la apolipoproteína A1**

30 Prioridad:

12.02.2009 US 152236 P

03.10.2008 US 102681 P

07.05.2009 US 176267 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.10.2019

73 Titular/es:

**CURNA, INC. (100.0%)
4400 Biscayne Boulevard
Miami, FL 33137, US**

72 Inventor/es:

**COLLARD, JOSEPH y
KHORKOVA, OLGA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 727 549 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de las enfermedades relacionadas con la apolipoproteína A1 por inhibición del transcrito antisentido natural a la apolipoproteína A1

5

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n. ° 61/102. 681 depositada el 3 de octubre de 2008, la solicitud de patente provisional de EE. UU. n. ° 61/152. 236 depositada el 12 de febrero de 2009 y la solicitud de patente provisional de EE. UU. n. ° 61/176. 267 depositada el 7 de mayo de 2009

10

CAMPO DE LA INVENCION

15 Los aspectos de la descripción comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o la función de la alipoproteína y las moléculas asociadas.

ANTECEDENTES

20 La hibridación ADN-ARN y ARN-ARN son importantes para muchos aspectos de la función del ácido nucleico, incluida la replicación, la transcripción y la traducción del ADN. La hibridación también es fundamental para una diversidad de tecnologías que detectan un ácido nucleico particular o alteran su expresión. Los nucleótidos antisentido, por ejemplo, interrumpen la expresión génica al hibridar con el ARN diana, interfiriendo de este modo con el splicing, la transcripción, la traducción y la replicación del ARN. El ADN antisentido tiene la característica

25 adicional de que los híbridos ADN-ARN sirven como un sustrato para la digestión por la ribonucleasa H, una actividad que está presente en la mayoría de los tipos de células. Las moléculas antisentido pueden suministrarse a las células, como es el caso de los oligodesoxinucleótidos (ODN), o pueden expresarse a partir de genes endógenos como moléculas de ARN. La FDA aprobó recientemente un fármaco antisentido, VITRAVENE™ (para el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus), que refleja que el antisentido tiene utilidad terapéutica.

30

RESUMEN

La invención se define por las reivindicaciones. Aquellos aspectos/casos de la presente descripción que constituyen la invención se definen por las reivindicaciones.

35

Este resumen se proporciona para presentar un resumen de la descripción para indicar brevemente la naturaleza y el contenido de la descripción. Se presenta con el entendimiento de que no se utilizará para interpretar o limitar el alcance o el significado de las reivindicaciones.

40 En un aspecto, la descripción proporciona procedimientos de inhibición de la acción de un transcrito antisentido natural mediante el uso de uno o más oligonucleótidos antisentido dirigidos a cualquier región del transcrito antisentido natural que resulta en una regulación positiva del gen sentido correspondiente. También se contempla en este documento que la inhibición del transcrito antisentido natural puede lograrse mediante siRNA, ribozimas y moléculas pequeñas, que se consideran dentro del alcance de la presente descripción.

45

Un aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de apolipoproteína (ApoA1) en células o tejidos de pacientes *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud donde dicho oligonucleótido tiene una identidad de secuencia de al menos el 50 % con un complemento inverso de un polinucleótido que

50 comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1-932 de la SEQ ID NO: 2 (Figura 8); de este modo, se modula la función y/o la expresión del polinucleótido de apolipoproteína (ApoA1) en células o tejidos de pacientes *in vivo* o *in vitro*.

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de los polinucleótidos de ApoA1, por ejemplo, los polinucleótidos expuestos como la SEQ ID NO: 2, y cualquier variante, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO:81-173.

55

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de apolipoproteína (ApoA1) en células o tejidos de pacientes *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas

60

células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud donde dicho oligonucleótido tiene una identidad de secuencia de al menos el 50 % con un complemento inverso del antisentido del polinucleótido de apolipoproteína (ApoA1); de este modo, se modula la función y/o la expresión del polinucleótido de apolipoproteína (ApoA1) en células o tejidos de pacientes in vivo o in vitro.

5

Otro aspecto proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de apolipoproteína (ApoA1) en células o tejidos de pacientes in vivo o in vitro que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud donde dicho oligonucleótido tiene una identidad de secuencia de al menos el 50 % con un oligonucleótido antisentido con respecto a un polinucleótido antisentido de apolipoproteína (ApoA1); de este modo, se modula la función y/o la expresión del polinucleótido de apolipoproteína (ApoA1) en células o tejidos de pacientes in vivo o in vitro.

10

En un aspecto preferido, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos de apolipoproteína (ApoA1) con sentido y/o antisentido.

15

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden uno o más nucleótidos modificados o sustituidos.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden uno o más enlaces modificados.

20 En otro aspecto más, los nucleótidos modificados comprenden bases modificadas que comprenden fosforotioato, metilfosfonato, ácidos nucleicos peptídicos o moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA). Preferentemente, los nucleótidos modificados son moléculas de ácido nucleico bloqueado, que incluyen α -L-LNA.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se administran a un paciente por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal.

25

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se administran en una composición farmacéutica. Un régimen de tratamiento comprende administrar los compuestos antisentido al menos una vez al paciente, sin embargo, este tratamiento puede modificarse para incluir múltiples dosis durante un período de tiempo. El tratamiento puede combinarse con uno o más tipos distintos de terapias.

30

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se encapsulan en un liposoma.

Otros aspectos se describen a *continuación*.

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico de los resultados de la PCR en tiempo real que muestran que los niveles de ARNm de ApoA1 en células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con algunos de los oligonucleótidos antisentido para DA327409ext antisentido de ApoA1. Las barras RH3-RH597 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 81-158.

40

La Figura 2 es un gráfico de los resultados de la PCR en tiempo real que muestran el nivel de cambio del ARNm de ApoA1 (panel superior) y del ARN de DA327409ext antisentido natural de ApoA1 (panel inferior) después del tratamiento de células HepG2 con LNA desnudo u oligonucleótidos de fosfotioato durante 7 días en comparación con el control. Las barras indicadas como # 6LNA, # 11LNA, # 6PS y # 11PS representan las SEQ ID NO: 159, 160, 161, 162 respectivamente.

45

La Figura 3 es un gráfico de los resultados de la PCR en tiempo real que muestran el nivel de cambio en el ARN de DA327409ext antisentido natural de ApoA1 (primera barra de cada par, sin relleno), y el ARNm de ApoA1, (segunda barra de cada par, con relleno) después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de LNA. Las barras indicadas como 6-11 corresponden a las SEQ ID NO 159, 167-170 y 160.

50

La Figura 4 muestra un aumento dependiente de la dosis en el ARNm de ApoA1 (panel inferior) y la proteína (panel superior) después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos. Las barras indicadas CUR-4806 y CUR-4811 corresponden a las SEQ ID NO 159 y 160 respectivamente.

55

La Figura 5 es un gráfico de los resultados de la PCR en tiempo real que muestran la regulación positiva del ARNm de ApoA1 en hepatocitos primarios de monos verdes africanos después del tratamiento con oligonucleótidos contra DA327409ext antisentido natural de ApoA1. Las barras indicadas CUR-4816 y CUR-4811 corresponden a las SEQ

60

ID NO 173 y 160 respectivamente.

La Figura 6 es un gráfico que muestra que los niveles de ARNm y proteína de ApoA1 aumentaron en las biopsias de hígado de mono después del tratamiento con CUR-962, un oligonucleótido diseñado para DA327409ext antisentido de ApoA1, en comparación con los niveles de referencia, de acuerdo con lo determinado por PCR en tiempo real y ELISA respectivamente (paneles de la derecha). Los niveles de ARNm o proteína de ApoA1 no cambiaron después del mismo período de tiempo en el grupo de control que recibió una dosis de un oligonucleótido que no mostró ningún efecto sobre los niveles de ApoA1 *in vitro* (CUR-963) (paneles de la izquierda). Las barras indicadas CUR-962 y CUR-963 corresponden a las SEQ ID NO: 170 y 171, respectivamente.

10 La Figura 7 muestra la SEQ ID NO 1, el ARNm de ApoA1 y la SEQ ID NO 1a, la secuencia genómica de ApoA1 del ensamblaje del genoma de UCSC, marzo de 2006 (<http://genome.ucsc.edu/index.html?org=Human&db=hg18&hgscid=144980821>), los exones se muestran en mayúscula, los intrones en minúscula)

La Figura 8 muestra la SEQ ID NO:2.

15

Las Figuras 9A-D muestran las SEQ ID NO:3-158.

La Figura 10 muestra las SEQ ID NO:159-173. * indica enlace fosfotioato, + indica modificación de LNA.

20 La Figura 11 muestra una alineación lado a lado de las secuencias antisentido naturales de ApoA1 humanas y de rhesus y la posición de algunos de los oligonucleótidos utilizados para dirigirse a estas secuencias.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 A continuación, se describen varios aspectos de la descripción con referencia a aplicaciones de ejemplo para ilustración. Debe entenderse que se exponen numerosos detalles, relaciones y procedimientos específicos para proporcionar un entendimiento completo de la descripción. Un experto en la materia relevante, sin embargo, reconocerá fácilmente que la descripción puede ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros procedimientos. La presente descripción no está limitada por el orden ilustrado de actos o acontecimientos, ya que algunos actos pueden producirse en diferentes órdenes y/o simultáneamente con otros actos o acontecimientos. Además, no se requieren todos los actos o acontecimientos ilustrados para implementar una metodología de acuerdo con la presente descripción.

35 Todos los genes, nombres de genes y productos de genes descritos en este documento pretenden corresponder a homólogos de cualquier especie para la cual son aplicables las composiciones y procedimientos descritos en este documento. Así, los términos incluyen, pero no se limitan a, genes y productos génicos de seres humanos y ratones. Se entiende que cuando se describe un gen o producto génico de una especie particular, esta descripción pretende ser solo ejemplar, y no debe interpretarse como una limitación a menos que el contexto donde aparece lo indique claramente. Así, por ejemplo, para los genes descritos en este documento, que en algunos aspectos se relacionan con el ácido nucleico de mamíferos y secuencias de aminoácidos se pretende que abarquen genes homólogos y/u ortólogos y productos génicos de otros animales que incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En aspectos preferidos, los genes o secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

Definiciones

45

La terminología utilizada en este documento tiene el objetivo de describir solo aspectos particulares y no pretende limitar la descripción. Como se usa en este documento, las formas singulares «un», «una» y «el», «la» pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, en la medida en que las expresiones «que incluye», «incluye», «que tiene», «tiene», «con», o variantes de las mismas se usan en la descripción detallada y/o en las reivindicaciones, dichas expresiones pretenden ser inclusivas de una manera similar a la expresión «que comprende».

55 El término «aproximadamente» significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular de acuerdo con lo determinado por un experto habitual en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, «aproximadamente» puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar, de acuerdo con la práctica en la técnica. Como alternativa, «aproximadamente» puede significar un intervalo de hasta el 20 %, preferentemente hasta el 10 %, más preferentemente hasta el 5 %, y aún más preferentemente hasta el 1 % de un valor dado. Como alternativa, en particular con respecto a los sistemas o procedimientos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud de un valor, preferentemente comprendido en 5 veces y más preferentemente, comprendido en 2 veces.

60

En los casos en que se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, el término «aproximadamente» significa que debe asumirse un intervalo de error aceptable para el valor particular.

- 5 Como se usa en este documento, el término «ARNm» significa (el) los transcrito(s) de ARNm actualmente conocido(s) de un gen dirigido, y cualquier transcrito adicional que pueda ser dilucidado.

Por «oligonucleótidos antisentido» o «compuesto antisentido» se entiende una molécula de ARN o de ADN que se une a otro ARN o ADN (ARN, ADN diana). Por ejemplo, si es un oligonucleótido de ARN, se une a otra diana de
 10 ARN por medio de interacciones ARN-ARN y altera la actividad del ARN diana (Eguchi y col., (1991) Ann. Rev. Biochem. 60, 631-652). Un oligonucleótido antisentido puede regular positivamente o regular negativamente la expresión y/o función de un polinucleótido particular. La definición pretende incluir cualquier molécula de ARN o ADN extraña que es útil desde un punto de vista terapéutico, de diagnóstico u otro. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas de ARN o ADN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), micro ARN, moléculas de ARN
 15 señuelo, siRNA, ARN enzimático, ARN de edición terapéutica y ARN agonista y antagonista, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), splicings alternativos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que se hibridan a al menos una parte del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

20

En el contexto de esta descripción, el término «oligonucleótido» se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. El término «oligonucleótido» también incluye oligómeros lineales o circulares de monómeros o enlaces naturales y/o modificados, que incluyen desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas sustituidas y alfa-anómeras de los mismos, ácidos nucleicos
 25 peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosforotioato, metilfosfonato y similares. Los oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido diana por medio de un patrón regular de interacciones monómero a monómero, tales como tipo de apareamiento de bases de Watson-Crick, tipos de apareamiento de bases de Hoögsteen o Hoögsteen inversa, o similares.

30 El oligonucleótido puede ser «quimérico», es decir, estar compuesto por diferentes regiones. En el contexto de esta descripción, los compuestos «quiméricos» son oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicas, por ejemplo, una o más regiones de ADN, una o más regiones de ARN, una o más regiones de PNA, etc. Cada región química está compuesta por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos típicamente comprenden al menos una región donde el oligonucleótido
 35 se modifica con el fin de mostrar una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, mayor resistencia a la degradación por nucleasas, mayor captación celular y/o mayor afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Las diferentes regiones del oligonucleótido pueden, por lo tanto, tener diferentes propiedades. Los oligonucleótidos quiméricos de la presente descripción pueden formarse como estructuras mixtas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o
 40 análogos de oligonucleótidos, como se ha descrito anteriormente.

El oligonucleótido puede estar compuesto por regiones que pueden enlazarse en «registro», es decir, cuando los monómeros se enlazan consecutivamente, como en el ADN nativo, o se enlazan mediante espaciadores. Se pretende que los espaciadores constituyan un «puente» covalente entre las regiones y tengan, en casos preferidos,
 45 una longitud que no supere aproximadamente los 100 átomos de carbono. Los espaciadores pueden portar diferentes funcionalidades, por ejemplo, tener carga positiva o negativa, portar propiedades de unión a ácido nucleico especiales (intercaladores, aglutinantes de surcos, toxinas, fluoróforos, etc.), ser lipófilos, inducir estructuras secundarias especiales como, por ejemplo, péptidos que contienen alanina que inducen hélices alfa.

50 Como se usa en este documento, «apolipoproteína» y «apolipoproteína A» incluyen todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, cadenas de polinucleótidos con sentido y antisentido, etc.

Como se usa en este documento, la expresión «oligonucleótido específico para» u «oligonucleótido que se dirige a»
 55 se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una parte del gen dirigido, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen dirigido. La estabilidad de los complejos y los dúplex puede determinarse mediante cálculos teóricos y/o ensayos *in vitro*. Los ensayos ejemplares para determinar la estabilidad de los complejos y dúplex de hibridación se describen en los ejemplos más adelante.

60

Como se usa en este documento, la expresión «ácido nucleico diana» abarca ADN, ARN (que comprende pre-ARNm y ARNm) transcrito a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado de dicho ARN, secuencias codificantes, no codificantes, polinucleótidos con sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos, que se hibridan específicamente con él, se denomina generalmente «antisentido». Las funciones del ADN a interferir incluyen, por ejemplo, la replicación y la transcripción. Las funciones del ARN a interferir incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, la translocación del ARN al sitio de traducción de proteína, la traducción de proteína del ARN, el splicing del ARN para producir una o más especies de ARNm, y la actividad catalítica que pueda ser acoplada o facilitada por el ARN. El efecto global de dicha interferencia con las funciones del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de un producto codificado u oligonucleótidos.

El ARN de interferencia «ARNi» está mediado por moléculas de ARN bicatenario (dsARN) que tienen homología específica de secuencia con sus secuencias de ácido nucleico «diana» (Caplen, N. J., y col., Proc. Natl Acad Sci. EE. UU. 98: 9742-9747 (2001)). En determinados aspectos de la presente descripción, los mediadores son dúplex de ARN «de interferencia pequeños» (siRNA) de 5-25 nucleótidos. Los siRNA se derivan del procesamiento de dsARN por una enzima RNasa conocida como Dicer (Bernstein, E., y col., Nature 409: 363-366 (2001)). Los productos dúplex de siRNA se reclutan en un complejo de siRNA multiproteína denominado RISC (complejo silenciador inducido por ARN). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree entonces que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente ARNm), donde el dúplex de siRNA interactúa de una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico (Bernstein, E., y col., Nature 409:363-366 (2001); Boutla, A., y col., Curr. Biol. 11: 1776-1780 (2001)). Los ARN de interferencia pequeños que pueden usarse de acuerdo con la presente descripción pueden sintetizarse y usarse de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos en la técnica y que serán familiares para el experto en la materia. Los ARN de interferencia pequeños para su uso en los procedimientos de la presente descripción comprenden adecuadamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En los ejemplos de aspectos no limitantes, los siRNA pueden comprender de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nt, o aproximadamente 20-25 nucleótidos.

La selección de oligonucleótidos adecuados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácido nucleico e indican regiones de identidad u homología. Dichos programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad adecuado entre especies. En el caso de genes que no han sido secuenciados, se realizan Southern blots para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Al realizar Southern blots a grados de rigurosidad variables, como es bien conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que muestran un alto grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana en un sujeto a controlar y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico correspondientes en otras especies. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay una libertad considerable en la selección de regiones adecuadas de genes para su uso en la presente descripción.

Por «ARN enzimático» se entiende una molécula de ARN con actividad enzimática (Cech, (1988) J. American. Med. Assoc. 260, 3030-3035). Los ácidos nucleicos enzimáticos (ribozimas) actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce a través de la parte de unión de diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Así, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y a continuación se une a un ARN diana mediante apareamiento de bases, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana.

Por «ARN señuelo» se entiende una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compite, por lo tanto, con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de ARN de respuesta de transactivación (TAR) del VIH puede actuar como un «señuelo» y se une de forma eficiente a la proteína tat del VIH, impidiendo de este modo que se una a secuencias TAR codificadas en el ARN del VIH (Sullenger y col., 1990, Cell, 63, 601-608). Esto pretende ser un ejemplo específico. Los expertos en la materia reconocerán que esto es solo un ejemplo, y fácilmente pueden generarse otros aspectos usando técnicas generalmente conocidas en la técnica.

Como se usa en este documento, el término «monómeros» típicamente indica monómeros unidos por enlaces

fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño de entre unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo, de entre aproximadamente 3-4, a aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos, fosforoselenoato, fosforamidoato y similares, como se describe más completamente más adelante.

5

En el presente contexto, los términos «nucleobase» y «nucleótidos» o «nucleósidos» se usan indistintamente en este documento y los términos incluyen nucleobases de origen natural, así como nucleobases de origen no natural. Debe ser evidente para el experto en la materia que se han descubierto posteriormente en la naturaleza diversas nucleobases que se consideraron anteriormente «de origen no natural». Así, «nucleobase» incluye no solo los
10 heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también análogos y tautómeros heterocíclicos de los mismos. Ejemplos ilustrativos de nucleobases son adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N⁶-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N⁴,N⁴-etanocitosina, N⁶,N⁶-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina<, 5-(C³-C⁶)-alquilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxil-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y las nucleobases de «origen no natural» descritas en Benner y col.,
15 la pat. de EE. UU. n.º 5.432.272. El término «nucleobase» pretende incluir todos y cada uno de estos ejemplos, así como análogos y tautómeros de los mismos. Las nucleobases especialmente interesantes son adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como las nucleobases de origen natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Nucleósido incluye los nucleósidos naturales, incluidas las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2ª ed. (Freeman, San
20 Francisco, 1992).

«Análogos» en referencia a los nucleósidos incluyen nucleósidos sintéticos que tienen restos de bases modificadas y/o restos de azúcar modificados, por ejemplo, descritos en general por Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, Nueva York, 1980; Freier & Altmann, Nucl. Acid. Res., 1997, 25(22), 4429-4443, Toulmé, J. J., Nature Biotechnology
25 19:17-18 (2001); Manoharan M., Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139(1999); Freier S. M., Nucleic Acid Research, 25:4429-4443 (1997), Uhlman, E., Drug Discovery & Development, 3:203-213 (2000), Herdewin P., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310 (2000).); 2'-O, 3'-C-enlazados [3. 2. 0] biclorabinonucleósidos (véase, por ejemplo, N. K Christensen., y col, J. Am. Chem. Soc., 120:5458-5463 (1998). Dichos análogos incluyen nucleósidos sintéticos diseñados para mejorar las propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad dúplex o tríplex,
30 la especificidad o similares.

Como se usa en este documento, «hibridación» significa el apareamiento de cadenas sustancialmente complementarias de compuestos oligoméricos. Un mecanismo de apareamiento implica enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o de Hoogsteen inverso, entre bases de nucleósidos
35 o de nucleótidos (nucleobases) complementarias de las cadenas de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleobases complementarias que se aparean mediante la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación puede producirse en circunstancias variables.

Un compuesto antisentido es «específicamente hibridable» cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para causar una modulación de la función y/o actividad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a las
40 secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se realizan ensayos en el caso de ensayos *in vitro* .

45

Como se usa en este documento, la frase «condiciones de hibridación rigurosas» o «condiciones rigurosas» se refiere a condiciones en las que un compuesto de la descripción se hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y en el contexto de esta descripción, las «condiciones rigurosas» donde los compuestos
50 oligoméricos se hibridan con una secuencia diana se determinan mediante la naturaleza y la composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos donde están siendo investigados. En general, las condiciones de hibridación rigurosas comprenden bajas concentraciones (< 0,15 M) de sales con cationes inorgánicas tales como Na⁺⁺ o K⁺⁺ (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20 °C-25 °C por debajo de la T_m del complejo de compuesto oligomérico: secuencia diana, y la presencia de desnaturizantes tales como formamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, o el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS). Por ejemplo, la tasa de hibridación disminuye un 1,1 % por cada 1 % de formamida. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta rigurosidad es 0,1X tampón cloruro de sodio-citrato de sodio (SSC)/0,1 % (peso/volumen) de SDS a 60 °C durante 30 minutos.

«Complementario», como se usa en este documento, se refiere a la capacidad para el apareamiento preciso entre
60 dos nucleobases en una o dos cadenas oligoméricas. Por ejemplo, si una nucleobase en una determinada posición

de un compuesto antisentido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con una nucleobase en una determinada posición de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana un ADN, ARN, o una molécula de oligonucleótido, entonces la posición del enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera una posición complementaria. El compuesto oligomérico y el ADN, ARN, o la molécula de oligonucleótido adicional son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por nucleobases que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Así, «específicamente hibridable» y «complementario» son expresiones que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad sobre un número suficiente de nucleobases de modo que se produzca la unión estable y específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

Se entiende en la técnica que no es necesario que la secuencia de un compuesto oligomérico sea un 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos, de modo que los segmentos intermedios o adyacentes no estén implicados en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura en bucle, un desapareamiento o una estructura de horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente descripción comprenden al menos aproximadamente el 70 %, o al menos aproximadamente el 75 %, o al menos aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 85 %, o al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %, o al menos aproximadamente el 99 % de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácidos nucleicos diana a la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido donde 18 de los 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios a una región diana y, por lo tanto, hibridarían específicamente, representaría el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no necesitan ser contiguos entre sí o a nucleótidos complementarios. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleótidos de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría el 77,8 % de complementariedad global con el ácido nucleico diana y así estaría dentro del alcance de la presente descripción. Es posible determinar el porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana de forma habitual con programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul y col., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). El porcentaje de homología, identidad de secuencias o complementariedad pueden determinarse, por ejemplo, por el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando la configuración predeterminada, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).

Como se usa en este documento, la expresión «punto de fusión térmico (T_m)» se refiere a la temperatura, bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos, a la que el 50 % de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Como las secuencias diana generalmente están presentes en exceso, en T_m, el 50 % de los oligonucleótidos están ocupados en el equilibrio). Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas donde la concentración de sales es la concentración de iones Na (u otras sales) de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para oligonucleótidos cortos (*por ejemplo*, de 10 a 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida.

Como se usa en este documento, «modulación» significa un incremento (estimulación) o una disminución (inhibición) de la expresión de un gen.

El término «variante», cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede abarcar una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen de tipo silvestre. Esta definición también puede incluir, por ejemplo, variantes «alélicas», de «splicing», de «especie» o «polimórficas». Una variante de splicing puede tener una identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un mayor o menor número de polinucleótidos debido al splicing alternativo de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la descripción las variantes de productos génicos de tipo silvestre. Las variantes pueden resultar de al menos una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden dar lugar a ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede o no estar alterada. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Los cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

60

Los polipéptidos resultantes generalmente tendrán una identidad significativa de aminoácidos los unos en relación con los otros. Una variante polimórfica es una variación en la secuencia de polinucleótidos de un gen particular entre individuos de una especie dada. Las variantes polimórficas también pueden abarcar «polimorfismos de un solo nucleótido» (SNP), o mutaciones de una sola base donde la secuencia de polinucleótidos varía en una base. La presencia de SNP puede ser indicativa de, por ejemplo, una determinada población con una propensión por una patología, es decir, la susceptibilidad frente a la resistencia.

Los polinucleótidos derivados incluyen ácidos nucleicos sometidos a modificación química, por ejemplo, sustitución de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados, por ejemplo, oligonucleótidos derivados, pueden comprender partes de origen no natural, tales como restos de azúcar alterados o enlaces entre azúcares. Ejemplos de estos son el fosforotioato y otras especies que contienen azufre que son conocidas en la técnica. Los ácidos nucleicos derivados también pueden contener marcadores, que incluyen radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Un polipéptido o péptido «derivado» es aquel que se modifica, por ejemplo, por glucosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico o tratamiento suave con formalina. Un derivado también puede modificarse para contener un marcador detectable, tanto directa como indirectamente, que incluye, pero no se limita a, un radioisótopo, un marcador fluorescente y enzimático.

Como se usa en este documento, el término «animal» o «paciente» pretende incluir, por ejemplo, seres humanos, ovejas, alces, venados, ciervos, mulos, visones, mamíferos, monos, caballos, ganado vacuno, cerdos, cabras, perros, gatos, ratas, ratones, aves, pollo, reptiles, peces, insectos y arácnidos.

«Mamífero» incluye mamíferos de sangre caliente que típicamente están bajo atención médica (por ejemplo, seres humanos y animales domesticados). Ejemplos incluyen felinos, caninos, equinos, bovinos y seres humanos, además de solo seres humanos.

«Tratar» o «tratamiento» incluye el tratamiento de una patología en un mamífero, e incluye:(a) evitar que se produzca la patología en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero tiene predisposición a la patología, pero todavía no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la patología, por ejemplo, detener su desarrollo; y/o (c) aliviar la patología, por ejemplo, causar la regresión de la patología hasta que se alcance un criterio de valoración deseado. Tratar también incluye la mejora de un síntoma de una enfermedad (por ejemplo, reducir el dolor o molestia), donde dicha mejora puede o no afectar directamente a la enfermedad (por ejemplo, causa, transmisión, expresión, etc.).

Composiciones y moléculas de polinucleótidos y oligonucleótidos

La lipoproteína de alta densidad (HDL) recoge el colesterol extra en la sangre y lo devuelve al hígado. La lipoproteína de baja densidad (o LDL) es el principal transportador de colesterol en el cuerpo. Pero un exceso de LDL durante muchos años puede provocar aterosclerosis (el estrechamiento y el endurecimiento de las arterias) y provocar una enfermedad cardíaca o un ataque cardíaco. La relación se determina dividiendo el colesterol LDL entre el colesterol HDL. Por ejemplo, si una persona tiene un colesterol HDL de 50 mg/dl y un colesterol LDL de 150 mg/dl, la relación HDL/LDL sería de 0,33. El objetivo es mantener la relación HDL/LDL por encima de 0,3, siendo la relación ideal HDL/LDL por encima de 0,4.

Dianas: En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de apolipoproteína (ApoA1), que incluyen, sin limitación, secuencias codificantes y/o no codificantes, con sentido y/o antisentido asociadas con ApoA. La apolipoproteína AI (ApoAI) humana es el principal componente proteico de las lipoproteínas de alta densidad (HDL y quilomicrones linfáticos. En el plasma humano se han nombrado cuatro lipoproteínas circulantes principales: quilomicrones (CM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). La HDL participa en la eliminación del colesterol de los tejidos periféricos al transportarlo al hígado o a otras lipoproteínas.

Las HDL se sintetizan *de novo* tanto en el hígado como en el intestino delgado como partículas con forma de disco ricas en proteínas. Las apoproteínas primarias de HDL son apoAI, apoAII, apoCI, apoCII y apoE. Las HDL recién formadas contienen muy poco colesterol y ésteres de colesterol. Las HDL se convierten de su forma discoidal inicial en partículas de lipoproteínas esféricas a través de la acumulación de ésteres de colesterol en el núcleo neutro de la partícula de lipoproteínas. El colesterol se acumula mediante HDL a partir de los restos de quilomicrones de los restos de VLDL (también llamadas lipoproteínas de densidad intermedia o IDL) y directamente de las membranas de la superficie celular. El colesterol se esterifica mediante la acción de una enzima asociada a HDL lecitina: colesterol

aciltransferasa («LCAT»). Para que la LCAT transfiera un ácido graso de la lecitina (fosfatidilcolina) al grupo de colesterol C-3-OH, se requiere la interacción con la ApoAI que se encuentra en la superficie de HDL. Esta acumulación de ésteres de colesterol del núcleo convierte HDL naciente a HDL₂ y HDL₃. Véase R. I. Levy y col., «The structure, function and metabolism of high-density lipoproteins: A status report», *Circulation*, vol. 62, pp. IV4-8 (1980); y D. I. Silverman y col., «High-density lipoprotein subfractions», *Am. J. Med.*, vol. 94, pág. 636-45 (1993).

Las HDL se aíslan generalmente del plasma por ultracentrifugación. El intervalo normal de densidad de HDL es de 1,063 g/ml a 1,21 g/ml, que se divide aproximadamente en dos intervalos HDL₂ 1,063 g/ml a 1,125 g/ml) y HDL₃ (1,125 g/ml a 1,21 g/ml). Más recientemente, se han identificado dos poblaciones principales de partículas en HDL mediante electroforesis bidimensional seguida de inmunotransferencia y un ensayo inmunoabsorbente diferencial de anticuerpos ligados a enzimas. Una de estas poblaciones contiene partículas con apoAI sola, y la otra contiene partículas con apoAI y apoAII. La proporción relativa de partículas de apoAI es la más alta en la fracción de HDL₂, mientras que HDL₃ es más una combinación de apoAI y apoAII. Véase J. C Fruchart y col., «Apolipoprotein A-containing lipoprotein particles: physiological role, quantification, and clinical significance», *Clin. Chem.*, vol. 38, pág. 793-7 (1992); y B. F. Asztalos y col., «Normolipidemic subjects with low HDL cholesterol levels have altered HDL subpopulations», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 17, pág. 1885-1893 (1997).

La apolipoproteína AI humana (ApoAI) es el principal componente proteico de HDL y los quilomicrones linfáticos. ApoAI se sintetiza principalmente en el hígado y el intestino delgado como una proteína precursora (preproapo AI). Preproapo AI se escinde intracelularmente para formar proapo AI, la forma secretada en el plasma y la linfa. En el plasma, seis aminoácidos se escinden de la proapo AI para formar ApoAI madura.

La ApoAI madura es un único polipéptido no glicosilado compuesto por 243 aminoácidos de secuencia conocida. La ApoAI sirve como cofactor de una enzima plasmática (lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT)), responsable de la formación de la mayoría de los ésteres de colesterol en plasma. La disminución de los niveles de ApoAI puede ocasionar trastornos del sistema de transporte de lípidos en plasma y el desarrollo de una enfermedad coronaria. Se ha demostrado que los niveles bajos tanto de ApoAI como de HDL son un fuerte factor de riesgo para los ataques cardíacos y otras enfermedades vasculares ateroscleróticas. Véanse las pat. de EE. UU. n.º 5. 059. 528 y 6. 258. 596.

En aspectos preferidos, se usan oligonucleótidos antisentido para evitar o tratar enfermedades o trastornos asociados con apolipoproteínas, lipoproteínas de alta densidad. Ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con los compuestos antisentido incluyen colesterol alto, relaciones HDL/LDL, artritis, enfermedad cardíaca, enfermedad de Tangier, amiloidosis sistémica no neuropática, otras enfermedades amiloides, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer, obesidad, aterosclerosis, inhibición del crecimiento tumoral dependiente de la angiogénesis, y de la disminución de los vasos sanguíneos existentes formados por tumores. También será efectivo en el tratamiento de enfermedades no cancerosas cuyos síntomas incluyen un aumento de la angiogénesis, por ejemplo, psoriasis, retinopatía del prematuro, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, artritis reumatoide, obesidad y psoriasis.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos de ApoA lo que incluye, sin limitación regiones no codificantes. Las dianas de ApoAI comprenden variantes de ApoA; mutantes de ApoA, incluidos SNP; secuencias no codificantes de ApoA; alelos, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

De acuerdo con aspectos de la descripción, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada a polinucleótidos de ApoA1 solo, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de ApoA.

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido está dirigido a una secuencia antisentido natural (antisentido natural a las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de ApoA1, incluyendo, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

En otro aspecto preferido, los compuestos oligoméricos de la presente descripción también incluyen variantes donde una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanósina o citidina en esta posición n. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones del compuesto antisentido. Estos compuestos se ensayan entonces usando los procedimientos descritos en este documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana, es de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 %.

Un compuesto antisentido se puede hibridar específicamente cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico diana para causar una pérdida de actividad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a las secuencias de ácidos nucleicos no diana en las condiciones en las que se desea la unión específica. Dichas condiciones incluyen, es decir, condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

Un compuesto antisentido, ya sea ADN, ARN, quimérico, sustituido etc., se puede hibridar específicamente cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para causar una pérdida de utilidad y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a las secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de los ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de los ensayos *in vitro*, en las condiciones en las que se realizan los ensayos.

En otro aspecto preferido, el direccionamiento de ApoA1, incluyendo sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como las SEQ ID NO:81 a 173, y similares, modulan la expresión o función de ApoA. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácidos nucleicos expuestas como las SEQ ID NO:81 a 173, incluyendo secuencias antisentido que se identifican y expanden, usando, por ejemplo, PCR, hibridación, etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente descripción puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es *en sí*, conocida y no es necesario describirla en este caso.

La especificidad y sensibilidad del antisentido también es aprovechada por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales y en el hombre. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado de forma segura y eficaz a seres humanos y actualmente hay numerosos ensayos clínicos en marcha. Así, se establece que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

En aspectos de la presente descripción, los compuestos antisentido oligoméricos, particularmente oligonucleótidos, se unen a moléculas de ácidos nucleicos diana y modulan la expresión y/o función de moléculas codificadas por un gen diana. Las funciones de ADN a interferir comprenden, por ejemplo, la replicación y la transcripción. Las funciones de ARN a interferir comprenden todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, la translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, la traducción de proteína desde ARN, el splicing del ARN para producir una o más especies de ARNm, y la actividad catalítica que puede estar acoplada o facilitada por el ARN. Las funciones pueden regularse positivamente o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

Los compuestos antisentido incluyen compuestos antisentido oligoméricos, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), splicings alternos, cebadores, sondas, y otros compuestos oligoméricos que se hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos

pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

5 El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de esta descripción, puede ser un procedimiento multietapa. El procedimiento generalmente empieza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya función va a modularse. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o patología particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente descripción, el ácido nucleico diana codifica la apolipoproteína (ApoA1).

10 El procedimiento de direccionamiento generalmente también incluye la determinación de al menos una región diana, segmento, o sitio dentro del ácido nucleico diana para que la interacción antisentido se produzca de forma que resulte el efecto deseado, por ejemplo, la modulación de la expresión. Dentro del contexto de la presente descripción, el término «región» se define como una parte del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de los ácidos nucleicos diana hay segmentos. «Segmentos» se definen como partes más pequeñas o subpartes de regiones dentro de un ácido nucleico diana. «Sitios», como se usa en la presente descripción, se define como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

20 En un aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales de la apolipoproteína (ApoA1) y modulan la expresión y/o la función de la apolipoproteína (ApoA1) (SEQ ID NO:1). Ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO:2, 81-173 (ApoA1). Otros ejemplos incluyen oligonucleótidos antisentido que comprenden la secuencia central gctagt (SEQ ID NO:175), tales como los oligonucleótidos de las SEQ ID NO 60-69 y 172.

25 En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de polinucleótidos de apolipoproteína (ApoA1) y modulan la expresión y/o función de la apolipoproteína (ApoA1). Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de los polinucleótidos con sentido o antisentido de apolipoproteína (ApoA1).

30 En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales de apolipoproteína (ApoA1) donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales de apolipoproteína (ApoA1) modulan la expresión y/o función de la apolipoproteína (ApoA1).

35 En otro aspecto preferido, los compuestos de oligonucleótido comprenden las secuencias expuestas como las SEQ ID NO:3 a 173, secuencias antisentido que se identifican y expanden usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente descripción puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es *en sí*, conocida y no es necesario describirla en este caso.

45 Ya que, como se conoce en la técnica, el codón de iniciación de la traducción típicamente es 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcrito; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se denomina el «codón AUG», el «codón de inicio» o el «codón de inicio AUG». Una minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha demostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan *in vivo*. Así, las expresiones «codón de iniciación de la traducción» y «codón de inicio» pueden abarcar muchas secuencias de codón, aun cuando el aminoácido iniciador en cada caso típicamente sea metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, uno cualquiera de los cuales puede utilizarse preferentemente para la iniciación de la traducción en un tipo particular de célula o tejido, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la descripción, «codón de inicio» y «codón de iniciación de la traducción» se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito de un gen que codifica la apolipoproteína (ApoA1), independientemente de la una o más secuencias de dichos codones. Un codón de terminación de la traducción (o «codón de parada») de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

60

Las expresiones «región de codón de inicio» y «región de codón de inicio de la traducción» se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de iniciación de la traducción. De forma análoga, las expresiones «región de codón de parada» y «región de codón de terminación de la traducción» se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de terminación de la traducción. En consecuencia, la «región de codón de inicio» (o «región de codón de iniciación de la traducción») y la «región de codón de parada» (o «región de codón de terminación de la traducción») son todas las regiones que pueden ser dirigidas de manera efectiva con los compuestos antisentido de la presente descripción.

10

El marco de lectura abierto (ORF) o «región codificante,» que se conoce en la técnica para referirse a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región que puede dirigirse de manera efectiva. Dentro del contexto de la presente descripción, una región dirigida es la región intragénica que abarca el codón de iniciación o de terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

15

Otra región diana incluye la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción, y que incluye, así, nucleótidos entre el sitio caperuza 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). Otra región diana más incluye la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y que incluye, por lo tanto, nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio caperuza 5' de un ARNm comprende un resto de guanosina N7 metilado unido al resto más 5' del ARNm mediante un enlace trifosfato 5'-5'. La región caperuza 5' de un ARNm se considera que incluye la propia estructura caperuza 5', así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio caperuza. Otra región diana para esta descripción es la región caperuza 5'.

20

25

Aunque algunos transcritos de ARNm eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como «intrones», que se escinden de un transcrito antes de que se traduzca. Las regiones restantes (y, por lo tanto, traducidas) se conocen como «exones» y se someten a splicing juntas para formar una secuencia de ARNm continua. En un aspecto, el direccionamiento de sitios de splicing, es decir, las uniones intrón-exón o uniones exón-intrón, es particularmente útil en situaciones donde el splicing aberrante participa en la enfermedad, o donde una producción en exceso de un producto de splicing particular participa en la enfermedad. Una unión de fusión aberrante debido al reordenamiento o delección es otro aspecto de un sitio diana. Los transcritos de ARNm producidos mediante el proceso de splicing de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como «transcritos de fusión». Los intrones pueden ser eficazmente dirigidos usando compuestos antisentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

30

35

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a regiones codificantes y/o no codificantes de un polinucleótido diana y modulan la expresión y/o función de la molécula diana.

40

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a polinucleótidos antisentido naturales y modulan la expresión y/o función de la molécula diana.

45

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a polinucleótidos con sentido y modulan la expresión y/o función de la molécula diana.

Pueden producirse transcritos de ARN alternativos a partir de la misma región genómica de ADN. Estos transcritos alternativos son generalmente conocidos como «variantes». Más específicamente, las «variantes de pre-ARNm» son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o de parada y contienen tanto secuencia intrónica como exónica.

50

Tras la escisión de una o más regiones de exón o intrón, o partes de las mismas durante el splicing, las variantes de pre-ARNm producen «variantes de ARNm» más pequeñas. En consecuencia, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante de pre-ARNm única siempre debe producir una variante de ARNm única como resultado del splicing. Estas variantes de ARNm también se conocen como «variantes de splicing alternativas». Si no se produce el splicing de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

55

60

Las variantes pueden producirse mediante el uso de señales alternativas para la transcripción de inicio o de parada.

Los pre-ARNm y ARNm pueden poseer más de un codón de inicio o codón de parada. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que usan codones de inicio alternativos se conocen como «variantes de inicio alternativas» de ese pre-ARNm o ARNm. Aquellos transcritos que usan un codón de parada alternativo se conocen como «variantes de parada alternativas» de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de parada alternativa es la «variante de poliA», donde los múltiples transcritos producidos resultan de la selección alternativa de una de las «señales de parada de poliA» por la maquinaria de transcripción, produciendo de este modo transcritos que terminan en sitios de poliA únicos. Dentro del contexto de la descripción, los tipos de variantes descritos en este documento también son aspectos de ácidos nucleicos diana.

10 Las ubicaciones en el ácido nucleico diana con las que los compuestos antisentido se hibridan se definen como al menos una parte de 5 nucleobases de una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido activo.

Aunque las secuencias específicas de determinados segmentos diana ejemplares se exponen en este documento, un experto en la materia reconocerá que estas sirven para ilustrar y describir los aspectos particulares dentro del alcance de la presente descripción. Los segmentos diana adicionales son fácilmente identificables por un experto en la materia en vista de esta descripción.

Los segmentos diana de 5-100 nucleótidos de longitud que comprenden un tramo de al menos cinco (5) nucleótidos consecutivos seleccionados de dentro de los segmentos diana preferidos ilustrativos también se consideran adecuados para el direccionamiento.

Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 5' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente corriente arriba del extremo 5' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). De forma similar, los segmentos diana preferidos se representan por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente corriente abajo del extremo 3' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Un experto en la materia armado con los segmentos diana ilustrados en este documento será capaz, sin excesiva experimentación, de identificar segmentos diana preferidos adicionales.

Una vez se han identificado una o más regiones, segmentos o sitios diana, se eligen los compuestos antisentido que sean suficientemente complementarios a la diana, es decir, se hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para proporcionar el efecto deseado.

En aspectos de la descripción, los oligonucleótidos se unen a una cadena antisentido de una diana particular. Los oligonucleótidos tienen al menos 5 nucleótidos de longitud y pueden sintetizarse de manera que cada oligonucleótido se dirija a secuencias solapantes de manera que los oligonucleótidos se sinteticen para cubrir toda la longitud del polinucleótido diana. Las dianas también incluyen regiones codificantes, además de no codificantes.

En un aspecto, se prefiere dirigirse a ácidos nucleicos específicos por oligonucleótidos antisentido. El direccionamiento de un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular es un procedimiento multietapa. El procedimiento generalmente empieza con la identificación de una secuencia de ácidos nucleicos cuya función va a modularse. Esta puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o patología particular, o un polinucleótido no codificante tal como, por ejemplo, ARN no codificante (ARNnc).

Los ARN pueden clasificarse en (1) ARN mensajeros (ARNm), que se traducen en proteínas, y (2) ARN no codificantes de proteína (ARNnc). Los ARNnc comprenden microARN, transcritos antisentido y otras unidades transcripcionales (TU) que contienen una alta densidad de codones de parada y que carecen de cualquier «marco de lectura abierto» extenso. Muchos ARNnc parecen empezar a partir de sitios de iniciación en regiones no traducidas 3' (3'UTRs) de loci codificantes de proteínas. Los ARNnc son frecuentemente raros y al menos la mitad de los ARNnc que se han secuenciado por el consorcio FANTOM no parecen estar poliadenilados. La mayoría de los investigadores se han basado, por motivos obvios, en ARNm poliadenilados que se procesan y se exportan al citoplasma. Recientemente, se demostró que el conjunto de ARN nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y que muchos de estos transcritos surgen de las llamadas regiones intergénicas (Cheng, J. y col. (2005) Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 308 (5725), 1149-1154; Kapranov, P. y col. (2005). Ejemplos de la arquitectura compleja del transcriptoma humano revelada por RACE y

matrices de mosaico de alta densidad. Genome Res 15 (7), 987-997). El mecanismo más común por el que los ARNnc pueden regular la expresión génica es por apareamiento de bases con transcritos diana. Los ARN que funcionan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) ARN codificados en cis que están codificados en la misma ubicación genética, pero en la cadena opuesta a los ARN donde actúan y, por lo tanto, muestran una perfecta complementariedad con su diana, y (2) ARN codificados en trans que están codificados en una ubicación cromosómica distinta de los ARN donde actúan y generalmente no muestran un potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos antisentido descritos en este documento puede alterar la expresión de los ARN mensajeros con sentido correspondientes. Sin embargo, esta regulación puede ser discordante (resultados de desactivación antisentido en la elevación del transcrito con sentido) o concordante (resultados de desactivación antisentido en la reducción del transcrito con sentido concomitante). En estos casos, los oligonucleótidos antisentido pueden dirigirse a partes solapantes o no solapantes de la cadena antisentido, lo que provoca la inactivación de la diana. El antisentido codificante, así como el no codificante, pueden ser dirigidos de una manera idéntica y esa categoría es capaz de regular los transcritos con sentido correspondientes, tanto de una manera concordante como discordante. Las estrategias que se emplean para identificar nuevos oligonucleótidos para su uso contra una diana pueden basarse en la inactivación de transcritos de ARN antisentido por oligonucleótidos antisentido o cualquier otro medio de modulación de la diana deseada.

Estrategia 1: En el caso de una regulación discordante, la inactivación del transcrito antisentido eleva la expresión del gen convencional (con sentido). Si el último gen debe codificar un fármaco diana conocido o supuesto, entonces la inactivación de su homólogo antisentido podría imitar posiblemente la acción de un agonista receptor o una enzima estimulante.

Estrategia 2: En el caso de una regulación concordante, podrían inactivarse de forma conjunta tanto los transcritos antisentido como con sentido y lograr de esa manera una reducción sinérgica de la expresión génica (con sentido) convencional. Si, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido se usa para lograr la inactivación, entonces esta estrategia puede usarse para aplicar un oligonucleótido antisentido dirigido al transcrito con sentido y otro oligonucleótido antisentido al transcrito antisentido correspondiente, o un único oligonucleótido antisentido energéticamente simétrico que se dirige simultáneamente a transcritos con sentido y antisentido solapantes.

De acuerdo con la presente descripción, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (ARNi) de ARN mono o bicatenario tales como compuestos de siRNA, y otros compuestos oligoméricos que se hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma habitual linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otra manera para que sean circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única cadena con autocomplementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Las modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto de ácido no nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el dsARN puede adoptar la forma de una molécula tipo horquilla autocomplementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. Así, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. La modulación específica de la expresión génica puede lograrse mediante la expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunos aspectos, la expresión o función génica está regulada positivamente. Cuando se forma a partir de dos cadenas, o una sola cadena que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones formadoras de dúplex de una sola cadena) son cadenas de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

Una vez introducidos en un sistema, los compuestos de la descripción pueden provocar la acción de una o más

enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden funcionar a través de mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo los oligonucleótidos) pueden describirse como «similares a ADN» (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o «similares a ARN» (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilo o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen una estructura similar a la forma B son «similares a ADN» y aquellos que tienen una estructura similar a la forma A son «similares a ARN». En algunos aspectos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

10

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos deseados o compuestos antisentido comprenden al menos uno de: ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia pequeño (siRNA); un microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (stARN); o un ARN de horquilla corto (shARN);
15 activación génica inducida por ARN pequeño (ARNa); ARN de activación pequeño (saARN), o combinaciones de los mismos.

20

El dsARN también puede activar la expresión génica, un mecanismo que se ha denominado «activación génica inducida por ARN pequeño» o ANRa. Los promotores génicos que se dirigen a dsARN inducen la potente activación transcripcional de los genes asociados. El ARNa se demostró en células humanas usando dsARN sintéticos, denominados «ARN de activación pequeño» (saARN). No se sabe actualmente si el ARNa se conserva en otros organismos.

25

Se ha descubierto que el ARN bicatenario pequeño (dcARN), tal como ARN de interferencia pequeño (siRNA) y el microARN (miARN), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como interferencia por ARN (ARNi). La ARNi conduce invariablemente al silenciamiento génico mediante la remodelación de cromatina para suprimir de este modo la transcripción, la degradación de ARNm complementario, o el bloqueo de la traducción de proteínas. Sin embargo, en los aspectos descritos en detalle en la sección de ejemplos a continuación, se muestra que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos de apolipoproteína y los productos codificados de los mismos. Los dsARN también pueden actuar como ARN de activación pequeños (saARN). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, al dirigir las secuencias en los promotores génicos, los saARN inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por dsARN (ARNa).

35

En un aspecto adicional, los «segmentos diana preferidos» identificados en este documento pueden emplearse en una selección de compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos de apolipoproteína (ApoA1). Los «moduladores» son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica la alipoproteína (ApoA1) y que comprenden al menos una parte de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana preferido. El procedimiento de selección comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de apolipoproteína (ApoA1) con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de apolipoproteína (ApoA1), por ejemplo, las SEQ ID NO:81-173. Una vez que se demuestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, tanto disminuir como aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de alipoproteína (ApoA1), el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos de alipoproteína (ApoA1), o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente descripción.

45

50

El direccionamiento de la secuencia antisentido modula preferentemente la función del gen diana. Por ejemplo, el gen de la apolipoproteína A1 (NM_000039; base de datos del genoma UCSC). En un aspecto preferido, la diana es un polinucleótido antisentido del gen de la apolipoproteína A1. En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias con sentido y/o antisentido naturales de polinucleótidos de alipoproteína (ApoA1) (por ejemplo, número de acceso NM_000039), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a las mismas. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o con sentido de ApoA1.

55

60

Los segmentos diana preferidos de la presente descripción también pueden combinarse con sus compuestos antisentido complementarios respectivos de la presente descripción para formar oligonucleótidos (duplexados) bicatenarios estabilizados.

Se ha demostrado en la técnica que dichos restos de oligonucleótido bicatenario modulan la expresión de la diana y regulan la traducción, así como el procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden estar sujetos a modificaciones químicas (Fire y col., Nature, 1998, 391, 806-811; Timmons y Fire, Nature 1998, 395, 854; Timmons y col., Gene, 2001, 263, 103-112; Tabara y col., Science, 1998, 282, 430-431; Montgomery y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 1998, 95, 15502-15507; Tuschl y col., Genes Dev., 1999, 13, 3191-3197; Elbashir y col., Nature, 2001, 411, 494-498; Elbashir y col., Genes Dev. 2001, 15, 188-200). Por ejemplo, se ha demostrado que dichos restos bicatenarios inhiben la diana mediante la hibridación clásica de la cadena antisentido del dúplex con la diana, desencadenando de este modo la degradación enzimática de la diana (Tijsterman y col., Science, 2002, 295, 694-697).

En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos de apolipoproteína (ApoA1) (por ejemplo, número de acceso NM_000039), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

De acuerdo con los aspectos de la descripción, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a la apolipoproteína (ApoA1) sola, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas de apolipoproteína (ApoA1).

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia natural antisentido de los polinucleótidos de ApoA1, por ejemplo, los polinucleótidos expuestos como las SEQ ID NO:2-165, y cualquier variante, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO:81 a 173.

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios o se unen a secuencias de ácido nucleico antisentido de apolipoproteína (ApoA1), que incluyen, sin limitación, secuencias no codificantes y/o antisentido asociadas a polinucleótidos de apolipoproteína (ApoA1) y modulan la expresión y/o función de moléculas de apolipoproteínas (ApoA1).

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos son complementarios o se unen a secuencias de ácido nucleico natural antisentido de ApoA1, expuestas como las SEQ ID NO:2, 173 y modulan la expresión y/o función de moléculas de ApoA1.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleobases consecutivas de las SEQ ID NO:81 a 173 y modulan la expresión y/o función de las moléculas de apolipoproteína (ApoA1).

Las dianas polinucleótidas comprenden ApoA, incluyendo miembros de la familia de las mismas, variantes de ApoA; mutantes de ApoA, incluyendo SNP; secuencias no codificantes de ApoA; alelos de apoA; variantes de especies, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

En otro aspecto preferido, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos de alipoproteína (ApoA1), comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia pequeño (siRNA); microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (stARN); o un ARN de horquilla corto (shARN); activación génica inducida por ARN pequeño (ARNa); o, ARN de activación pequeño (saARN).

En otro aspecto preferido, el direccionamiento de los polinucleótidos de apolipoproteína (ApoA1), por ejemplo, las SEQ ID NO:81 a 173, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

En otro aspecto preferido, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO:81 a 173. Estos oligonucleótidos pueden comprender una o más nucleobases modificadas, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

En otro aspecto preferido, las SEQ ID NO:81 a 173 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede llevarse a cabo de varias maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, siARN, etc. Las moléculas de ácidos nucleico enzimáticas (por ejemplo, las ribozimas) son moléculas de ácido nucleico capaces de catalizar una o más de diversas reacciones, que incluyen la capacidad para escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas en un modo

específico de secuencia de bases de nucleótidos. Dichas moléculas de ácido nucleico enzimáticas, se pueden usar, por ejemplo, para dirigir prácticamente cualquier transcrito de ARN (Zaug y col., 324, Nature 429 1986; Cech, 260 JAMA 3030, 1988; y Jefferies y col., 17 Nucleic Acids Research 1371, 1989).

5 Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácido nucleico enzimáticas de escisión trans se muestran prometedoras como agentes terapéuticos para enfermedades humanas (Usman y McSwiggen, 1995 Ann. Rep. Med. Chem. 30, 285-294; Christoffersen y Marr, 1995 J. Med. Chem. 38, 2023-2037). Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticas pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del fondo del ARN celular. Un acontecimiento de escisión de este tipo hace que el ARNm no sea funcional y anula la expresión de proteínas de
10 ese ARN. De este modo, la síntesis de una proteína asociada a una patología puede inhibirse de forma selectiva.

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce a través de la parte de unión de diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Así,
15 el ácido nucleico enzimático reconoce primero y a continuación se une a un ARN diana mediante el apareamiento de bases complementario, y una vez se une al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de unirse un ácido nucleico enzimático y escindir su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

20 Varios enfoques, tales como estrategias de selección (evolución) *in vitro* (Orgel, 1979, Proc. R. Soc. London, B 205, 435) se han utilizado para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar una diversidad de reacciones, como la escisión y la ligadura de enlaces fosfodiéster y enlaces amida, (Joyce, 1989, Gene, 82, 83-87; Beaudry y col., 1992, Science 257, 635-641; Joyce, 1992, Scientific American 267, 90-97; Breaker y col., 1994,
25 TIBTECH 12, 268; Bartel y col., 1993, Science 261:1411-1418; Szostak, 1993, TIBS 17, 89-93; Kumar y col., 1995, FASEB J., 9, 1183; Breaker, 1996, Curr. Op. Biotech., 7, 442).

El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuiría significativamente a cualquier estrategia que empleara ribozimas que escinden ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima de
30 cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una velocidad catalítica (k_{cat}) de aproximadamente 1 min^{-1} en presencia de concentraciones de saturación (10 mM) de cofactor de Mg^{2+} . Se ha demostrado que una ribozima de «ligasa de ARN» artificial cataliza la reacción de automodificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min^{-1} . Además, se sabe que determinadas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen grupos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de
35 renovación que se aproximan a 100 min^{-1} . Finalmente, la sustitución de un resto específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con determinados análogos de nucleótido proporciona ribozimas modificadas que muestran una mejora de hasta 10 veces en la velocidad catalítica. Estos hallazgos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con velocidades catalíticas que son significativamente superiores a aquellas mostradas *in vitro* por la mayoría de las ribozimas naturales de autoescisión. Entonces es posible que las
40 estructuras de determinadas ribozimas que se autoescinden puedan optimizarse para proporcionar la máxima actividad catalítica, o que puedan prepararse motivos de ARN completamente nuevos que muestran velocidades significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiéster de ARN.

La escisión intermolecular de un sustrato de ARN por un catalizador de ARN que se ajusta al modelo de «cabeza de
45 martillo» se mostró por primera vez en 1987 (Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328:596-600). El catalizador de ARN se recuperó y se hizo reaccionar con múltiples moléculas de ARN, lo que demuestra que era verdaderamente catalítico.

Los ARN catalíticos diseñados en función del motivo «cabeza de martillo» se han utilizado para escindir secuencias
50 diana específicas al realizar los cambios de base adecuados en el ARN catalítico para mantener el apareamiento de bases necesario con las secuencias diana (Haseloff y Gerlach, Nature, 334, 585 (1988); Walbot y Bruening, Nature, 334, 196 (1988); Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328:596-600; Koizumi, M., Iwai, S. y Ohtsuka, E. (1988) FEBS Lett., 228:228-230). Esto ha permitido el uso del ARN catalítico para escindir secuencias diana específicas e indica que los ARN catalíticos diseñados de acuerdo con el modelo de «cabeza de martillo» pueden escindir posiblemente
55 ARN de sustrato específico *in vivo*. (véase Haseloff y Gerlach, Nature, 334, 585 (1988); Walbot y Bruening, Nature, 334, 196 (1988); Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328:596-600).

El ARN de interferencia (ARNi) se ha convertido en una poderosa herramienta para modular la expresión génica en mamíferos y células de mamífero. Este enfoque requiere el suministro de ARN de interferencia pequeño (siRNA)
60 bien como el propio ARN o bien como ADN, usando un plásmido de expresión o virus y la secuencia codificante

para ARN de horquilla corto que se procesa a siRNA. Este sistema permite el transporte eficaz de los pre-siRNA al citoplasma donde son activos y permiten el uso de promotores regulados y específicos de tejido para la expresión génica.

- 5 En un aspecto preferido, un oligonucleótido o compuesto antisentido comprende un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (ADN), o un mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleótidos de origen natural, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (estructura), así como oligonucleótidos que tienen partes de origen no natural que funcionan de forma similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente deseados con
10 respecto a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, mayor captación celular, afinidad mejorada por un ácido nucleico diana y mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

De acuerdo con la presente descripción, los oligonucleótidos o «compuestos antisentido» incluyen oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, ARN, ADN, mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos), ribozimas,
15 oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (ARNi) de ARN mono o bicatenario tales como compuestos de siRNA, saARN, ARNa, y otros compuestos oligoméricos que se hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden
20 contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma habitual linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otra manera para que sean circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única cadena con autocomplementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o
25 parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Las modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos,
30 posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto de ácido no nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el dsARN puede adoptar la forma de una molécula tipo horquilla autocomplementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. Así, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. La modulación específica de la expresión génica se puede lograr mediante la expresión estable de las horquillas de dsARN en líneas de células transgénicas (Hammond y col., (1991) Nat. Rev. Genet.,
35 1991, 2, 110-119; Matzke y col., Curr. Opin. Genet. Dev., 2001, 11, 221-227; Sharp, Genes Dev., 2001, 15, 485-490). Cuando se forma a partir de dos cadenas, o una sola cadena que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones formadoras de dúplex de una sola cadena) son cadenas de ARN complementarias que se aparean con bases en el
40 modo de Watson-Crick.

Una vez introducidos en un sistema, los compuestos de la descripción pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden funcionar a través de mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo los
45 oligonucleótidos) pueden describirse como «similares a ADN» (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o «similares a ARN» (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilo o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen una estructura similar a la forma B son «similares a ADN» y aquellos que tienen una
50 estructura similar a la forma A son «similares a ARN». En algunos aspectos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

Los compuestos antisentido de acuerdo con esta descripción pueden comprender una parte antisentido de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleótidos (es decir, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80
55 nucleósidos enlazados) de longitud. Esto se refiere a la longitud de la cadena antisentido o parte del compuesto antisentido. En otras palabras, un compuesto antisentido monocatenario de la descripción comprende de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos, y un compuesto antisentido bicatenario de la descripción (tal como un dsARN, por ejemplo) comprende una cadena o parte antisentido de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que este comprenda partes antisentido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,
60 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48,

49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

- En un aspecto, los compuestos antisentido de la descripción tienen partes antisentido de 10 a 50 nucleótidos de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que estos incorporan oligonucleótidos que tienen partes antisentido de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias. En algunos aspectos, los oligonucleótidos tienen 15 nucleótidos de longitud.
- 10 En un aspecto, los compuestos antisentido o de oligonucleótido de la descripción tienen partes antisentido de 12 o 13 a 30 nucleótidos de longitud. Un experto en la materia apreciará que estos integran compuestos antisentido que tienen partes antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.
- 15 En un aspecto preferido, la administración de al menos un oligonucleótido dirigido a uno o más polinucleótidos de apolipoproteína (ApoA1) evita o trata enfermedades asociadas con la expresión o función anormal de los polinucleótidos de apolipoproteína (ApoA1) y productos codificados de los mismos, u otras enfermedades relacionadas. Ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con los oligonucleótidos antisentido comprenden: colesterol alto, enfermedades cardiovasculares, enfermedad cardíaca, enfermedad de Tangier, artritis, inflamación, autoinmunidad, enfermedades inflamatorias, enfermedades o trastornos neurológicos (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson); neurodegeneración, cáncer, enfermedades o trastornos causados por organismos extraños tales como virus, bacterias, parásitos, hongos y similares.
- 20 En otro aspecto preferido, los compuestos oligoméricos de la presente descripción también incluyen variantes donde una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de dsARN. Estos compuestos se ensayan entonces usando los procedimientos descritos en este documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.
- 30 En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana, es de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 %.
- 40 En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido, tales como, por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico expuestas en la SEQ ID NO: 3 a 172 comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).
- 45 En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácido nucleico que detectan y/o son antisentido de las secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas con ApoA1 y las secuencias expuestas como las SEQ ID NO:1, 2. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NO:1, 2.
- 50 Determinados oligonucleótidos preferidos de esta descripción son los oligonucleótidos quiméricos. «Oligonucleótidos quiméricos» o «quimeras», en el contexto de esta descripción, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos típicamente contienen al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, una mayor resistencia a nucleasas, una mayor captación en células, una mayor afinidad de unión por la diana) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de ARNasa H, por lo tanto, produce la escisión de la diana de ARN, mejorando de este modo en gran medida la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. En consecuencia, con frecuencia pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxi oligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan con la
- 60

misma región diana. La escisión de la diana de ARN puede detectarse habitualmente mediante electroforesis en gel y, si es necesario, con las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica. En un aspecto preferido, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión a la diana, y, generalmente, una región que actúa como un sustrato para la ARNasa H. La afinidad de un oligonucleótido por su diana (en este caso, un ácido nucleico que codifica ras) se determina habitualmente midiendo la T_m de un par de oligonucleótidos/diana, que es la temperatura a la que se disocian el oligonucleótido y la diana; la disociación se detecta de forma espectrofotométrica. Cuanto mayor sea la T_m , mayor será la afinidad del oligonucleótido por la diana.

10 Se pueden formar compuestos antisentido quiméricos de la descripción como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos, como se ha descrito anteriormente. Dichos compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gapmeros. Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. n.º 5. 013. 830; 5,149,797; 5, 220,007; 5,256,775; 15 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; y 5,700,922.

En otro aspecto preferido, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, lo más preferentemente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-flúor. En otros aspectos preferidos, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones de 2'-flúor, 2'-amino y 2'-O-metilo en la ribosa de pirimidinas, restos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Dichas modificaciones se incorporan habitualmente en los oligonucleótidos y se ha demostrado que estos oligonucleótidos tienen una mayor T_m (es decir, mayor afinidad de unión a diana) que los 2'-desoxioligonucleótidos frente a una diana dada. El efecto de dicha afinidad aumentada es mejorar en gran medida la inhibición por oligonucleótidos de ARNi de la expresión génica. La ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de los dúplex de ARN:ADN; por lo tanto, la activación de esta enzima produce la escisión del ARN diana, y así puede mejorar en gran medida la eficiencia de inhibición de ARNi. La escisión del ARN diana puede demostrarse habitualmente por electroforesis en gel. En otro aspecto preferido, el oligonucleótido quimérico también se modifica para mejorar la resistencia a nucleasas. Las células contienen diversas exo y endonucleasas que pueden degradar ácidos nucleicos. Se ha demostrado que varias modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido donde se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a nucleasas se mide habitualmente incubando oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones de nucleasa aisladas y midiendo el grado de oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, generalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que se han modificado para mejorar su resistencia a nucleasas sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos sin modificar. Se ha demostrado que 35 diversas modificaciones de oligonucleótidos mejoran o confieren resistencia a nucleasas. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato son actualmente más preferidos. En algunos casos, las modificaciones de oligonucleótidos que mejoran la afinidad de unión a diana son, también, independientemente, capaces de mejorar la resistencia a nucleasas. Algunas modificaciones deseables pueden encontrarse en De Mesmaeker y col. Acc. Chem. Res. 1995, 28: 366-374.

40 Ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos concebidos por esta descripción incluyen aquellos que comprenden estructuras modificadas, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los más preferidos son los oligonucleótidos con estructuras de fosforotioato y aquellos con 45 estructuras de heteroátomos, particularmente $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$ [conocido como metileno (metilimino) o estructura MMI], $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ y estructuras $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2$, donde la estructura nativa de fosfodiéster se representa como O-P-O-CH_2 . Las estructuras de amida descritas por De Mesmaeker y col. Acc. Chem. Res. 1995, 28:366-374) también se prefieren. También se prefieren los oligonucleótidos que tienen estructuras de morfolino (Summerton y Weller, patente de EE. UU. n.º 5. 034. 506). 50 Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos En otros aspectos preferidos, tal como la estructura de ácido nucleico peptídico (PNA), la estructura de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por una estructura de poliamida, uniéndose los nucleótidos directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la estructura de poliamida (Nielsen y col. Science 1991, 254, 1497). de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2':OH, SH, SCH_3 , F, OCN, OCH_3OCH_3 , $\text{OCH}_3\text{O(CH}_2\text{)}_n$ 55 CH_3 , $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$ o $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$ donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo inferior C_1 a C_{10} , alcóxialcoxi, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo; Cl; Br; CN; CF_3 ; OCF_3 ; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH_3 ; SO_2CH_3 ; ONO_2 ; NO_2 ; N_3NH_2 ; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo reportero; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de 60 un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-

metoxietoxi [2'-O-CH₂CH₂ OCH₃, también conocido como 2'-O- (2-metoxietil)] (Martin y col., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486). Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂ CH₂CH₃) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' y la posición 5' del nucleótido del terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden incluir, además o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (con frecuencia denominadas en la técnica simplemente «base»). Como se usa en este documento, 10 nucleobases «no modificadas» o «naturales» incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleobases encontradas solo con poca frecuencia o de forma transitoria en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y con frecuencia denominada en la técnica 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, así como nucleobases sintéticas, por ejemplo, 2- 15 aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N₆ (6-aminoxetil)adenina y 2,6-diaminopurina. Kornberg, A., *DNA Replication*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1980, pág. 75-77; Gebeyehu, G., y col. *Nucl. Acids Res.* 1987, 15: 4513). Puede incluirse una base «universal» conocida en la técnica, por ejemplo, la inosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-Me-C 20 aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pág. 276-278) y son sustituciones de bases actualmente preferidas.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la descripción implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o 25 más restos o conjugados que mejoran la actividad o captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen, pero no se limitan a, restos lipídicos, tales como un resto de colesterol, un resto de colesterilo (Letsinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 1989, 86, 6553), ácido cólico (Manoharan y col., *Bioorg. Med. Chem. Let.* 1994, 4, 1053-), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan y col., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992, 660, 306; Manoharan y col. *Bioorg. Med. Chem. Let.* 1993, 3, 2765-), un tiocolesterol (Oberhauser y col., *Nucl. Acids Res.* 1992, 20, 533), una 30 cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras y col. *EMBO J.* 1991, 10, 111; Kabanov y col. *FEBS Lett.* 1990, 259, 327; Svinarchuk y col. *Biochimie* 1993, 75, 49), un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan y col. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 3651; Shea y col. *Nucl. Acids Res.* 1990, 18, 3777), una cadena de poliamina o polietilenglicol (Manoharan y col. *Nucleosides & Nucleotides* 1995, 14, 969), o ácido acético adamantano (Manoharan y col. 35 *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 3651). Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y los procedimientos de preparación de dichos oligonucleótidos, son conocidos en la técnica, por ejemplo, las patentes de EE. UU n. ° 5. 138. 045, 5. 218. 105 y 5. 459. 255.

No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado estén uniformemente modificadas, y de hecho 40 más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede incorporarse en un único oligonucleótido o incluso dentro de un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente descripción también incluye oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos, como se ha definido anteriormente en este documento.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de la presente descripción está conjugada con otro resto que incluye, 45 pero no se limita a, nucleótidos abásicos, poliéter, poliamina, poliamidas, péptidos, hidratos de carbono, lípido, o compuestos de polihidrocarburo. Los expertos en la materia reconocerán que estas moléculas pueden enlazarse a uno o más de cualquiera de los nucleótidos que comprenden la molécula de ácido nucleico en varias posiciones en el azúcar, base o grupo fosfato.

50 Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta descripción pueden prepararse de manera práctica y habitual mediante la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para dichas síntesis es comercializado por varios proveedores que incluyen Applied Biosystems. También se puede emplear cualquier otro medio para dicha síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos está bien dentro de los talentos de un experto en la materia. También es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y 55 derivados alquilados. También es muy conocido usar técnicas similares y amiditos modificados disponibles en el mercado y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditos modificados con psoraleno y/o CPG (disponible en Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos marcados de forma fluorescente, biotinilados u otros oligonucleótidos modificados tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.

60

De acuerdo con la descripción, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para mejorar la potencia, la especificidad y la duración de la acción y ampliar las vías de administración de los oligonucleótidos que comprenden las químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. (ref: Recent advances in the medical chemistry of antisense oligonucleotide por Uhlman, Current Opinions en Drug Discovery & Development 2000 vol 3 n. ° 2). Esto puede lograrse sustituyendo algunos de los monómeros en los presentes oligonucleótidos por monómeros de LNA. El oligonucleótido modificado con LNA puede tener un tamaño similar al compuesto parental o puede ser más grande o preferentemente más pequeño. Se prefiere que dichos oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 60 %, lo más preferentemente menos de aproximadamente el 50 % de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

Las estructuras de oligonucleótidos modificados preferidas comprenden, pero no se limitan a, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos que comprenden 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que comprenden 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida, donde los pares adyacentes de las unidades de nucleósidos están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También están incluidas diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. n. ° 3. 687. 808; 4. 469. 863; 4. 476. 301; 5. 023. 243; 5. 177. 196; 5. 188. 897; 5. 264. 423; 5. 276. 019; 5. 278. 302; 5. 286. 717; 5. 321. 131; 5. 399. 676; 5. 405. 939; 5. 453. 496; 5. 455. 233; 5. 466. 677; 5. 476. 925; 5. 519. 126; 5. 536. 821; 5. 541. 306; 5. 550. 111; 5. 563. 253; 5. 571. 799; 5. 587. 361; y 5. 625. 050.

Las estructuras de oligonucleótidos modificados preferidas que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos tienen estructuras que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos comprenden aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); estructuras de siloxano; estructuras de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras de formacetilo y tioformacetilo; estructuras de metilenformacetilo y tioformacetilo; estructuras que contienen alqueno; estructuras de sulfamato; estructuras de metilnimino y metilhidrazino; estructuras de sulfonato y sulfonamida; estructuras de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos.

Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. n. ° 5. 034. 506; 5. 166. 315; 5. 185. 444; 5. 214. 134; 5. 216. 141; 5. 235. 033; 5. 264. 562; 5. 264. 564; 5. 405. 938; 5. 434. 257; 5. 466. 677; 5. 470. 967; 5. 489. 677; 5. 541. 307; 5. 561. 225; 5. 596. 086; 5. 602. 240; 5. 610. 289; 5. 602. 240; 5. 608. 046; 5. 610. 289; 5. 618. 704; 5. 623. 070; 5. 663. 312; 5. 633. 360; 5. 677. 437; y 5. 677. 439.

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, la estructura, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana adecuado. Dicho compuesto oligomérico, un mimético de oligonucleótido que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, la estructura de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por una estructura que contiene amida, en particular una estructura de aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte de amida de la estructura. Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos de PNA comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. n. ° 5. 539. 082; 5. 714. 331; y 5. 719. 262.

Se puede encontrar información adicional sobre los compuestos de PNA en Nielsen y col., Science, 1991, 254, 1497-1500.

En otro aspecto preferido de la descripción, los oligonucleótidos con estructuras de fosforotioato y oligonucleósidos con estructuras de heteroátomos, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-, se conocen como metileno (metilimino) o estructura MMI, -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -ON(CH₃)-CH₂-CH₂- donde la estructura nativa de fosfodiéster se representa como -O-P-O-CH₂- de la patente de EE. UU. n. ° 5. 489. 677 mencionada anteriormente, y la estructura de amida de la patente de EE. UU. n. ° 5. 602. 240 mencionada anteriormente. También se prefieren los oligonucleótidos que tienen estructuras de morfolino de la patente de EE.

UU. n. ° 5. 034. 506, mencionada anteriormente.

- Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2':OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alquenoilo; O-, S- o N-alquinoilo; u O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alquenoilo y alquinoilo pueden ser alquilo C a CO sustituido o no sustituido o alquenoilo y alquilo C₂ a CO. Son particularmente preferidos O (CH₂)_nO_mCH₃, O(CH₂)_n, OCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON(CH₂)_nCH₃)₂ donde n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2':C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo reportero, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y col., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), es decir, un grupo alcoxi. Una modificación preferida adicional comprende 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo O (CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos de este documento a continuación, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica) como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.
- 20 Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-O CH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en oligonucleótidos enlazados en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero sin limitación, las patentes de EE. UU. n. ° 4. 981. 957; 5. 118. 800; 5. 319. 080; 5. 359. 044; 5. 393. 878; 5. 446. 137; 5. 466. 786; 5. 514. 785; 5. 519. 134; 5. 567. 811; 5. 576. 427; 5. 591. 722; 5. 597. 909; 5. 610. 300; 5. 627. 053; 5. 639. 873; 5. 646. 265; 5. 658. 873; 5. 670. 633; y 5. 700. 920.
- 30 Los oligonucleótidos también pueden comprender modificaciones o sustituciones de nucleobases (con frecuencia denominadas en la técnica simplemente «base»). Como se usa en este documento, nucleobases «no modificadas» o «naturales» comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas comprenden otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halógeno, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Además, las nucleobases comprenden las descritas en la patente de Estados Unidos n. ° 3. 687. 808, las descritas en 'The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering', páginas 858-859, Kroschwitz, JI, ed. John Wiley & Sons, 1990, las descritas por Englisch y col, 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, página 613, y las descritas por Sanghvi, Y. S., capítulo 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289 -302, Crooke, S. T. y Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la descripción. Estas comprenden pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y actualmente son las sustituciones base preferidas, aún más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-O-metoxietilo.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de las nucleobases modificadas indicadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas, comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. n. ° 3. 687. 808, así como 4. 845. 205; 5. 130. 302; 5. 134. 066; 5. 175. 273; 5. 367. 066; 5. 432. 272; 5. 457. 187; 5. 459. 255; 5. 484. 908; 5. 502. 177; 5. 525. 711; 5. 552. 540; 5. 587. 469; 5. 596. 091; 5. 614. 617; 5. 750. 692 y 5. 681. 941.

60 Otra modificación de los oligonucleótidos de la descripción implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o

más restos o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular, o la captación celular del oligonucleótido.

Dichos restos comprenden, pero no se limitan a, restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 5 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan y col., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser y col., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecandiol o undecilo (Kabanov y col., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk y col., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan y col., Tetrahedron 10 Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea y col., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una cadena de poliamina o polietilenglicol (Mancharan y col., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano acético (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra y col., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke y col., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

15

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichos conjugados de oligonucleótidos comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. n.º 4. 828. 979; 4. 948. 882; 5. 218. 105; 5. 525. 465; 5. 541. 313; 5. 545. 730; 5. 552. 538; 5. 578. 717; 5. 580. 731; 5. 580. 731; 5. 591. 584; 5. 109. 124; 5. 118. 802; 5. 138. 045; 5. 414. 077; 5. 486. 603; 5. 512. 439; 5. 578. 718; 5. 608. 046; 4. 587. 044; 4. 605. 735; 4. 667. 025; 4. 762. 779; 4. 789. 737; 4. 824. 941; 4. 835. 263; 4. 876. 335; 4. 904. 582; 4. 958. 013; 5. 082. 830; 5. 112. 963; 5. 214. 136; 5. 082. 830; 5. 112. 963; 5. 214. 136; 5. 245. 022; 5. 254. 469; 5. 258. 506; 5. 262. 536; 5. 272. 250; 5. 292. 873; 5. 317. 098; 5. 371. 241, 5.391, 723; 5. 416. 203, 5. 451. 463; 5. 510. 475; 5. 512. 667; 5. 514. 785; 5. 565. 552; 5. 567. 810; 5. 574. 142; 5. 585. 481; 5. 587. 371; 5. 595. 726; 5. 597. 696; 5. 599. 923; 5. 599. 928 y 5. 688. 941.

25

Descubrimiento de fármacos: Los compuestos de la presente descripción también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente descripción comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos identificados en este documento en los esfuerzos de descubrimiento de fármacos para dilucidar la relación que existe entre los polinucleótidos de alipoproteína (ApoA1) y una patología, fenotipo o 30 afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular los polinucleótidos de alipoproteína (ApoA1) que comprenden poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente descripción, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de los polinucleótidos de alipoproteína (ApoA1) y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o una muestra tratada con otro compuesto de la descripción.

35 Estos procedimientos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el procedimiento de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

40 **Evaluación de la regulación positiva o inhibición de la expresión génica:**

La transferencia de un ácido nucleico exógeno a una célula u organismo huésped puede evaluarse detectando directamente la presencia del ácido nucleico en la célula u organismo. Dicha detección puede lograrse mediante varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la presencia del ácido nucleico exógeno puede 45 detectarse por Southern blot o por una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores que amplifican específicamente secuencias de nucleótidos asociadas al ácido nucleico. La expresión de los ácidos nucleicos exógenos también puede medirse usando procedimientos convencionales que incluyen el análisis de expresión génica. Por ejemplo, el ARNm producido a partir de un ácido nucleico exógeno puede detectarse y cuantificarse usando una Northern blot y PCR con transcripción inversa (RT-PCR).

50

La expresión de un ARN del ácido nucleico exógeno también puede detectarse midiendo una actividad enzimática o una actividad de proteína reportera. Por ejemplo, puede medirse la actividad moduladora antisentido indirectamente como una disminución o aumento en la expresión de ácido nucleico diana como una indicación de que el ácido nucleico exógeno está produciendo el ARN efector. Basándose en la conservación de secuencias, pueden diseñarse 55 cebadores y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante más altamente expresada de cada gen puede usarse para construir un gen de control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla insertando cada región codificante entre una región codificante reportera y su señal de poli(A). Estos plásmidos producirían un ARNm con un gen reportero en la parte cadena arriba del gen y una posible diana de ARNi en la región no codificante 3'. La efectividad de los oligonucleótidos antisentido individuales se ensayaría por modulación del gen reportero. Los genes reporteros 60

útiles en los procedimientos de la presente descripción incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta-glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína cian fluorescente (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS), y derivados de las mismas. Hay disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a la ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los procedimientos para la determinación de la modulación de un gen reportero son muy conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, procedimientos fluorimétricos (por ejemplo, espectroscopía de fluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.

Kits, reactivos de investigación, diagnósticos y agentes terapéuticos

Los compuestos de la presente descripción pueden utilizarse para diagnósticos, agentes terapéuticos y profilaxis, y como reactivos de investigación y componentes de kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con exquisita especificidad, son usados con frecuencia por los expertos en la materia para dilucidar la función de genes particulares o para distinguir entre funciones de diversos miembros de una vía biológica.

Para su uso en kits y diagnósticos y en diversos sistemas biológicos, los compuestos de la presente descripción, tanto solos como en combinación con otros compuestos o agentes terapéuticos, son útiles como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para dilucidar patrones de expresión de una parte o de todo el complemento de genes expresados dentro de células y tejidos.

Como se usa en este documento, la expresión «sistema biológico» o «sistema» se define como cualquier organismo, célula, cultivo de célula o tejido que se expresa, o se hace competente para expresar los productos de los genes de apolipoproteína (ApoA1). Estos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

Como un ejemplo no limitante, los patrones de expresión dentro de células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido se comparan con células o tejidos de control no tratados con compuestos antisentido y los patrones producidos se analizan para niveles diferenciales de expresión génica, ya que están relacionados, por ejemplo, con la asociación a la enfermedad, la vía de señalización, la localización celular, el nivel de expresión, el tamaño, la estructura o la función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o sin estimular y en presencia o ausencia de otros compuestos que afectan los patrones de expresión.

Ejemplos de procedimientos de análisis de expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices de ADN o micromatrices (Brazma y Vilo, FEBS Lett., 2000 480, 17-24; Celis, y col., FEBS Lett., 2000 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de la expresión génica) (Madden, y col., Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425), READS (amplificación con enzimas de restricción de los ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72), TOGA (análisis de expresión génica total) (Sutcliffe, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 2000, 97, 1976-81), matrices de proteínas y proteómica (Celis, y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblut, y col., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de la etiqueta de secuencia expresada (EST) (Celis, y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, y col., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huellas de ARN sustractivas (SuRF) (Fuchs, y col., Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson, y col., Cytometry, 2000, 41, 203-208), clonación sustractiva, visualización diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, y col., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) (Going y Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904) y procedimientos de espectrometría de masas (De, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41).

Los compuestos de la descripción son útiles para la investigación y el diagnóstico, debido a que estos compuestos se hibridan con ácidos nucleicos que codifican apolipoproteína (ApoA1). Por ejemplo, los oligonucleótidos que se hibridan con dicha eficiencia y en dichas condiciones que se han descrito en este documento como moduladores eficientes de alipoproteína (ApoA1) son cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o detección, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácido nucleico que codifican apolipoproteína (ApoA1) y en la amplificación de dichas moléculas de ácido nucleico para la detección o para el uso en estudios posteriores de apolipoproteína (ApoA1). La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, en particular los cebadores y las sondas, de la descripción con un ácido nucleico que codifica apolipoproteína (ApoA1) puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden incluir la conjugación de una enzima con el oligonucleótido, el radiomarcaje del

oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel de alipoproteína (ApoA1) en una muestra.

La especificidad y sensibilidad del antisentido también es aprovechada por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado compuestos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales, que incluyen seres humanos. Los fármacos de oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y de forma eficaz a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. Así, se establece que los compuestos antisentido pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

Para los agentes terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, sospechoso de tener una enfermedad o trastorno que se puede tratar modulando la expresión de los polinucleótidos de apolipoproteína (ApoA1) se trata mediante la administración de compuestos antisentido de acuerdo con esta descripción. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva del modulador de alipoproteína (ApoA1). Los moduladores de apolipoproteína (ApoA1) de la presente descripción modulan de manera efectiva la actividad de la proteína apolipoproteína (ApoA1) o modulan la expresión de la proteína apolipoproteína (ApoA1). En un aspecto, la actividad o expresión de alipoproteína (ApoA1) en un animal se inhibe aproximadamente un 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión de alipoproteína (ApoA1) en un animal se inhibe en aproximadamente en un 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión de alipoproteína (ApoA1) en un animal se inhibe en un 50 % o más. Así, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de apolipoproteína (ApoA1) en al menos un 10 %, en al menos un 50 %, en al menos un 25 %, en al menos un 30 %, en al menos un 40 %, en al menos un 50 %, en al menos un 60 %, en al menos un 70 %, en al menos un 75 %, en al menos un 80 %, en al menos un 85 %, en al menos un 90 %, en al menos un 95 %, en al menos un 98 %, en al menos un 99 %, o en un 100 % en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión de apolipoproteína (ApoA1) y/o en un animal se incrementa en aproximadamente un 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión de alipoproteína (ApoA1) en un animal se incrementa en aproximadamente un 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión de alipoproteína (ApoA1) en un animal se incrementa en un 50 % o más. Así, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de apolipoproteína (ApoA1) en al menos un 10 %, en al menos un 50 %, en al menos un 25 %, en al menos un 30 %, en al menos un 40 %, en al menos un 50 %, en al menos un 60 %, en al menos un 70 %, en al menos un 75 %, en al menos un 80 %, en al menos un 85 %, en al menos un 90 %, en al menos un 95 %, en al menos un 98 %, en al menos un 99 %, o en un 100 % en comparación con un control.

Por ejemplo, la reducción de la expresión de la apolipoproteína (ApoA1) se puede medir en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro fluido corporal, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células contenidas dentro de dichos fluidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica los péptidos de apolipoproteína (ApoA1) y/o la proteína apolipoproteína (ApoA1) en sí misma.

Los compuestos de la descripción pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad efectiva de un compuesto a un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. El uso de los compuestos y procedimientos de la descripción también pueden ser útiles profilácticamente.

45 **Conjugados**

Otra modificación de los oligonucleótidos de la descripción implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular, o la captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos de manera covalente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la descripción incluyen intercaladores, moléculas reporteras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros, y grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterol, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta descripción, incluyen grupos que mejoran la captación, mejoran la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Los grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta descripción, incluyen grupos que mejoran la captación, la distribución, el metabolismo o la eliminación de los compuestos de la presente descripción. Los grupos conjugados representativos se describen en la solicitud de patente internacional n. ° PCT/US92/09196,

depositada el 23 de octubre de 1992, y la patente de EE. UU. n.º 6. 287. 860.

Los restos conjugados incluyen, pero no se limitan a, restos de lípidos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritiltilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la descripción también pueden conjugarse con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de dichos conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. n.º 4,828,979; 4. 948. 882; 5. 218. 105; 5. 525. 465; 5. 541. 313; 5. 545. 730; 5. 552. 538; 5. 578. 717, 5. 580. 731; 5. 580. 731; 5. 591. 584; 5. 109. 124; 5. 118. 802; 5. 138. 045; 5. 414. 077; 5. 486. 603; 5. 512. 439; 5. 578. 718; 5. 608. 046; 4. 587. 044; 4. 605. 735; 4. 667. 025; 4. 762. 779; 4. 789. 737; 4. 824. 941; 4. 835. 263; 4. 876. 335; 4. 904. 582; 4. 958. 013; 5. 082. 830; 5. 112. 963; 5. 214. 136; 5. 082. 830; 5. 112. 963; 5. 214. 136; 5. 245. 022; 5. 254. 469; 5. 258. 506; 5. 262. 536; 5. 272. 250; 5. 292. 873; 5. 317. 098; 5. 371. 241, 5. 391. 723; 5. 416. 203, 5. 451. 463; 5. 510. 475; 5. 512. 667; 5. 514. 785; 5. 565. 552; 5. 567. 810; 5. 574. 142; 5. 585. 481; 5. 587. 371; 5. 595. 726; 5. 597. 696; 5. 599. 923; 5. 599. 928 y 5. 688. 941.

Formulaciones

Los compuestos de la descripción también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otra manera a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas formulaciones de ayuda en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. n.º 5. 108. 921; 5. 354. 844; 5. 416. 016; 5. 459. 127; 5. 521. 291; 5. 543. 165; 5. 547. 932; 5. 583. 020; 5. 591. 721; 4. 426. 330; 4. 534. 899; 5. 013. 556; 5. 108. 921; 5. 213. 804; 5. 227. 170; 5. 264. 221; 5. 356. 633; 5. 395. 619; 5. 416. 016; 5. 417. 978; 5. 462. 854; 5. 469. 854; 5. 512. 295; 5. 527. 528; 5. 534. 259; 5. 543. 152; 5. 556. 948; 5. 580. 575; y 5. 595. 756.

Aunque los oligonucleótidos antisentido no necesitan administrarse en el contexto de un vector con el fin de modular la expresión y/o función de una diana, los aspectos de la descripción se refieren a construcciones de vectores de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido, que comprenden promotores, secuencias de genes promotores híbridos y poseen una fuerte actividad promotora constitutiva, o una actividad promotora que puede inducirse en el caso deseado.

En un aspecto, la práctica de la descripción implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de suministro de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no viral enlazado operativamente al polinucleótido. Ejemplos de dichos vectores no virales incluyen el oligonucleótido solo (por ejemplo, uno cualquiera o más de las SEQ ID NO:81 a 173) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

Los sistemas de suministro de ácidos nucleicos adecuados adicionales incluyen un vector viral, típicamente la secuencia de al menos uno de un adenovirus, un virus asociado a adenovirus (AAV), un adenovirus dependiente de auxiliar, un retrovirus, o un complejo de virus hemaglutinante de Japón-liposoma (HVJ). Preferentemente, el vector viral comprende un promotor eucariota fuerte enlazado operativamente al polinucleótido, por ejemplo, un promotor del citomegalovirus (CMV).

Los vectores preferidos adicionales incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en el VIH. Un vector viral basado en el VIH preferido comprende al menos dos vectores donde los genes gag y pol son de un genoma del VIH y el gen *env* es de otro virus. Se prefieren los vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de pox tales como vectores de ortopox o avipox, vectores del virus del herpes tales como un vector del virus del herpes simple I (HSV) [Geller, A. I. y col., J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., y col., en DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford Inglaterra) (1995); Geller, A. I. y col., Proc Natl. Acad. Sci.: EE. UU. :90 7603 (1993); Geller, A. I., y col., Proc Natl. Acad. Sci EE. UU.: 87:1149 (1990)], Adenovirus Vectors [LeGal LaSalle y col.,

Science, 259:988 (1993); Davidson, y col., Nat. Genet. 3:219 (1993); Yang, y col., J. Virol. 69:2004 (1995)] y vectores de virus adeno-asociados [Kaplitt, M. G., y col., Nat. Genet. 8: 148 (1994)].

Los compuestos antisentido de la descripción abarcan cualquier sal, éster o sal de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, que incluye un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o resto del mismo.

La expresión «sales farmacéuticamente aceptables» se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la descripción: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para los oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE. UU n. ° 6. 287. 860.

La presente descripción también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido de la descripción. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse de varias formas dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas que incluyen el suministro vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para la administración por vía oral. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción, que pueden presentarse de manera práctica en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el (los) vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y a continuación, si fuera necesario, moldeando el producto.

Las composiciones de la presente descripción pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente descripción también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas de la presente descripción pueden comprender uno o más potenciadores de la penetración, vehículos, excipientes u otros principios activos o inactivos.

Las emulsiones típicamente son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que generalmente superan los 0,1 µm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales, además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente bien como una solución en la fase acuosa, la fase oleosa o bien el mismo como una fase independiente. Las microemulsiones están incluidas como un aspecto de la presente descripción. Las emulsiones y sus usos son muy conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de EE. UU. n. ° 6. 287. 860.

Las formulaciones de la presente descripción incluyen formulaciones liposomales. Como se usa en la presente descripción, el término «liposoma» significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada por un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a suministrarse. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que se cree que interactúan con moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están

cargados negativamente atrapan el ADN en vez de formar complejos con él. Se han usado tanto liposomas catiónicos como no catiónicos para suministrar ADN a las células.

5 Los liposomas también incluyen liposomas «estabilizados estéricamente», una expresión que, como se usa en este documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan a los liposomas, estos lípidos especializados producen liposomas con vidas en circulación mejoradas con respecto a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos donde parte de la parte lipídica formadora de vesícula del liposoma comprende uno o más glucolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus
10 usos se describen adicionalmente en la patente de EE. UU. n.º 6. 287. 860.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden incluir tensioactivos. El uso de tensioactivos en productos farmacológicos, formulaciones y en emulsiones es bien conocido en la técnica. Los tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE. UU. n.º 6. 287. 860.

15 En un aspecto, la presente descripción emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar el suministro eficiente de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar en la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también mejoran la permeabilidad de los fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de las cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos
20 no quelantes. Los potenciadores de la penetración y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE. UU. n.º 6. 287. 860.

Un experto en la materia reconocerá que las formulaciones se diseñan habitualmente de acuerdo con su uso
25 previsto, es decir, su vía de administración.

Las formulaciones preferidas para la administración tópica incluyen aquellas donde los oligonucleótidos de la descripción están en mezcla con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros
30 (por ejemplo, dioleoil-fosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina) negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleoil-tetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoil-fosfatidiletanolamina DOTMA).

Para la administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la descripción pueden encapsularse dentro de liposomas
35 o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden formar complejos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres preferidos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE. UU. n.º 6. 287. 860.

40 Las composiciones y formulaciones para la administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales preferidas son aquellas donde los oligonucleótidos de la descripción se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración,
45 tensioactivos y quelantes. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos biliares/sales y ácidos grasos preferidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE. UU. n.º 6. 287. 860. También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de la
50 penetración adicionales incluyen éter polioxietilen-9-laurílico, éter polioxietilen-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la descripción pueden suministrarse por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o en complejos para formar micro o nanopartículas. Los agentes complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE. UU. n.º 6. 287. 860.

55 Las composiciones y formulaciones para la administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no se limitan a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

60 Determinados aspectos de la descripción proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más

compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, fármacos quimioterapéuticos para el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, esorrubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetilnitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxurea, desoxicoformicina, 4-hidroxihipoxipurofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la descripción, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un período de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de otros de dichos agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Los fármacos antiinflamatorios, que incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, pero no se limitan a, ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la descripción. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del alcance de esta descripción. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

En otro aspecto relacionado, las composiciones de la descripción pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a una segunda diana de ácido nucleico. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular de apolipoproteína (ApoA1), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la descripción pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones de la misma diana de ácido nucleico de apolipoproteína (ApoA1). Se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido en este documento y otros pueden seleccionarse de entre compuestos adecuados conocidos en la técnica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

30

Dosificación:

Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) está dentro de la experiencia de los expertos en la materia. La dosificación depende de la gravedad y la capacidad de respuesta de la patología a tratar, con el curso del tratamiento que dura desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden estimarse basándose en las CE_{50} que se consideran efectivas en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 μ g a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la materia pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos corporales o tejidos. Tras el tratamiento satisfactorio, puede desearse que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para evitar la reaparición de la patología, donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que varían de 0,01 μ g a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años.

Aunque diversos aspectos de la presente descripción se han descrito anteriormente, debe entenderse que se han presentado a modo de ejemplo solamente, y no de limitación. Pueden realizarse numerosos cambios a los aspectos descritos de acuerdo con la descripción en este documento sin apartarse del espíritu o alcance de la descripción. Por lo tanto, la amplitud y el alcance de la presente descripción no deben estar limitados por ninguno de los aspectos descritos anteriormente.

Por su citación en diversas referencias en este documento, los solicitantes no admiten que ninguna referencia particular sea «técnica anterior» a su invención. Las realizaciones de composiciones y procedimientos inventivos se ilustran en los siguientes ejemplos.

60

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos no limitantes sirven para ilustrar realizaciones seleccionadas de la invención. Se apreciará que las variaciones en las proporciones y alternativas en los elementos de los componentes mostrados serán evidentes para los expertos en la materia y están dentro del alcance de los aspectos de la presente descripción.

5 **Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido y/ o cadena con sentido de un polinucleótido de apolipoproteína (ApoA1)**

Como se indicó anteriormente, la expresión «oligonucleótido específico para» u «oligonucleótido que se dirige a» se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una parte del gen dirigido, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen dirigido.

La selección de oligonucleótidos adecuados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácido nucleico e indican regiones de identidad u homología. Dichos programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad adecuado entre especies. En el caso de genes que no han sido secuenciados, se realizan Southern blots para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Al realizar Southern blots a grados de rigurosidad variables, como es bien conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que muestran un alto grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana en un sujeto a controlar y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico correspondientes en otras especies. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay una libertad considerable en la selección de regiones adecuadas de genes para su uso en la presente invención.

Un compuesto antisentido es «específicamente hibridable» cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para causar una modulación de la función y/o actividad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a las secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se realizan ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

Las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos descritos en este documento pueden determinarse mediante uno o más ensayos *in vitro* como se conoce en la técnica. Por ejemplo, las propiedades de los oligonucleótidos descritos en este documento pueden obtenerse mediante la determinación de la fuerza de unión entre el antisentido natural diana y una posible molécula de fármaco utilizando el ensayo de curva de fusión.

La fuerza de unión entre el antisentido natural diana y una posible molécula de fármaco (Molécula) puede estimarse usando cualquiera de los procedimientos establecidos de medición de la fuerza de interacciones intermoleculares, por ejemplo, un ensayo de curva de fusión.

El ensayo de curva de fusión determina la temperatura a la que se produce una rápida transición de conformación bicatenaria a monocatenaria para el complejo antisentido/Molécula natural. Esta temperatura es ampliamente aceptada como una medida fiable de la fuerza de interacción entre las dos moléculas.

Puede realizarse un ensayo de curva de fusión usando una copia de ADNc de la molécula de ARN antisentido natural real o un nucleótido de ADN o ARN sintético correspondiente al sitio de unión de la Molécula. Están disponibles múltiples kits que contienen todos los reactivos necesarios para realizar este ensayo (por ejemplo, kit MeltDoctor de Applied Biosystems Inc.). Estos kits incluyen una solución tampón adecuada que contiene uno de los colorantes de unión a ADN bicatenario (dsADN) (tales como los colorantes ABI HRM, SYBR Green, SYTO, etc.). Las propiedades de los colorantes de dsADN son tales que casi no emiten fluorescencia en forma libre, pero son altamente fluorescentes cuando se unen a dsADN.

Para realizar el ensayo, el ADNc o un oligonucleótido correspondiente se mezclan con la Molécula en concentraciones definidas por los protocolos particulares del fabricante. La mezcla se calienta a 95 °C para disociar todos los complejos de dsADN previamente formados, a continuación, se enfría lentamente a temperatura ambiente u otra temperatura menor definida por el fabricante del kit para permitir que se hibriden las moléculas de ADN. A continuación, los complejos recién formados se calientan lentamente a 95 °C con la recopilación de datos continua simultánea sobre la cantidad de fluorescencia que se produce por la reacción. La intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a las cantidades de dsADN presentes en la reacción. Los datos pueden recopilarse

usando un instrumento de PCR en tiempo real compatible con el kit (por ejemplo, sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus de ABI o el instrumento LightTyper, Roche Diagnostics, Lewes, Reino Unido).

Los picos de fusión se construyen representando la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura $(-d(\text{fluorescencia})/dT)$ sobre el eje y) frente a la temperatura (eje x) usando el software adecuado (por ejemplo, LightTyper (Roche) o SDS Dissociation Curve, ABI). Los datos se analizan para identificar la temperatura de la rápida transición del complejo de dsADN a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se llama T_m y es directamente proporcional a la fuerza de la interacción entre las dos moléculas. Típicamente, la T_m superará los 40 °C.

10

Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos ApoA1

Materiales y procedimientos:

15 Las células se trataron con cualquiera de los siguientes procedimientos:

Procedimiento 1: Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido desnudos:

Se cultivaron células HepG2 de ATCC (cat # HB-8065) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone cat # SH30024, o Mediatech cat # MT-10-010-CV) +10 % FBS (Mediatech cat # MT35- 011-CV)+ penicilina/estreptomicina (Mediatech cat # MT30-002-CI)) a 37 °C y 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse en placas a la densidad de $0,5 \times 10^4$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se reemplazó con 1,5 ml/pocillo de medio de crecimiento fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron en agua a la concentración de 20 µM. Se mezclaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio de crecimiento fresco y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles tratados de forma simulada. Después de 3-18 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂ el medio se cambió a medio de crecimiento fresco. 72 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, las células se volvieron a distribuir como se describe anteriormente. 48-72 h después de la segunda dosificación, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat # Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat # 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat # AB1453B) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorear la expresión génica mediante PCR en tiempo real utilizando la mezcla de expresión de gen ABI Taqman (cat # 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (para 18S cat # 4319413E, para ApoA1 Hs00163641_m1, Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) utilizando el termociclador Mx4000 (Stratagene). El nivel de cambio en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferencia de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada.

Procedimiento dos: Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido:

Se cultivaron células HepG2 de ATCC (cat # HB-8065) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone cat # SH30024, o Mediatech cat # MT-10-010-CV) +10 % FBS (Mediatech cat # MT35- 011-CV)+ penicilina/estreptomicina (Mediatech cat # MT30-002-CI)) a 37 °C y 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse en placas a la densidad de $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat # 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat # 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados de forma simulada. Después de 3-18 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂ el medio se cambió a medio de crecimiento fresco. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat # Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat # 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat # AB1453B) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorear la expresión génica mediante PCR en tiempo real utilizando la mezcla de expresión de gen ABI Taqman (cat # 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (para 18S cat # 4319413E, para ApoA1

Hs00163641_m1, Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) utilizando el termociclador Mx4000 (Stratagene). El nivel de cambio en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferencia de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras 5 tratadas y las transfectadas de forma simulada.

Resultados:

Los resultados de la PCR en tiempo real muestran que los niveles de mRNA de ApoA1 en células HepG2 aumentan 10 significativamente en las células HepG2 48 h después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido para DA327409ext antisentido de ApoA1 (Fig. 1).

Ejemplo 3: Modulación de la expresión del gen ApoA1

15 Materiales y procedimientos

Las células se trataron con cualquiera de los siguientes procedimientos:

Procedimiento 1: Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido desnudos:

- 20 Se cultivaron células HepG2 en MEM/EBSS (Hyclone cat # SH30024) + 10 % de FBS + penicilina + estreptomina a 37 °C y 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse en placas a la densidad de 1,5 x 10⁴/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a MEM/EBSS fresco + 10 % de FBS. Todos los oligonucleótidos antisentido fabricados por 25 IDT se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco cat # 31985-070) y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados de forma simulada. 72 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se repitió el procedimiento de dosificación como se describe anteriormente.
- 30 48-72 h después de la dosificación repetida, se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat # Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat # 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat # AB1453B) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorear la expresión génica mediante PCR 35 tiempo real utilizando la mezcla de expresión de gen ABI Taqman (cat # 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (para 18S cat # 4319413E, para ApoA1 Hs00163641_m1, y un ensayo diseñado especialmente para antisentido de ApoA1 DA327409ext, todo por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) utilizando el termociclador Mx4000 (Stratagene).
- 40 El nivel de cambio en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferencia de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada. Cebadores y sondas para el ensayo Taqman diseñado a medida para el DA327409ext antisentido natural de ApoA1. Las letras mayúsculas indican desoxirribonucleótidos no modificados
Secuencia de cebador directo CTCCTCCTGCCACTTCTTCTG (SEQ ID NO:163)
- 45 Secuencia de cebador inverso CTGGTGGATGAAGAAGGTTTGC (SEQ ID NO:164)
Secuencia de la sonda (marcada con FAM) TTTGGATCTGGACGACTTC (SEQ ID NO:165)

Procedimiento dos: Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido:

- 50 Se cultivaron células HepG2 de ATCC (cat # HB-8065) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone cat # SH30024, o Mediatech cat # MT-10-010-CV) +10 % FBS (Mediatech cat # MT35- 011-CV)+ penicilina/estreptomina (Mediatech cat # MT30-002-Cl)) a 37 °C y 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse en placas a la densidad de 1,5 x 10⁵/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento fresco. Todos los 55 oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat # 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat # 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados de forma simulada. Después de 3-18 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂ el medio se cambió a 60 medio de crecimiento fresco. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se

extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat # Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat # 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat # AB1453B) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorear la expresión génica mediante PCR en tiempo real utilizando la mezcla de expresión de gen ABI Taqman (cat # 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (para 18S cat # 4319413E, para ApoA1 Hs00163641_m1, y un ensayo diseñado especialmente para antisentido de ApoA1 DA327409ext, todo por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) utilizando el termociclador Mx4000 (Stratagene). El nivel de cambio en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferencia de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada.

Cebadores y sondas para el ensayo Taqman diseñado a medida para el DA327409ext antisentido natural de ApoA1. Las letras mayúsculas indican desoxirribonucleótidos no modificados

15 Secuencia de cebador directo CTCCTCCTGCCACTTCTTCTG (SEQ ID NO:163)

Secuencia de cebador inverso CTGGTGGATGAAGAAGGTTTGC (SEQ ID NO:164)

Secuencia de la sonda (marcada con FAM) TTTGGATCTGGACGACTTC (SEQ ID NO:165).

Tratamiento de hepatocitos primarios de mono. Se introdujeron hepatocitos primarios de mono en el cultivo por RxGen Inc. y se colocaron en placas de 6 pocillos. Se trataron con oligonucleótidos de la siguiente manera. Los medios en las placas de 6 pocillos se cambiaron a medios de crecimiento frescos que consisten en Medio de William (Sigma cat # W4128) suplementado con 5 % de FBS, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina, 4 µg/ml de insulina, dexametasona 1 µM, 10 µg/ml de Fungin (InvivoGen, San Diego CA). Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat # 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat # 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados de forma simulada. Después de 3-18 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, el medio se cambió a medio de crecimiento fresco. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat # Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat # 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat # AB1453B) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorear la expresión génica mediante PCR en tiempo real utilizando la mezcla de expresión de gen ABI Taqman (cat # 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (para 18S cat # 4319413E, para ApoA1 Hs00163641_m1, y un ensayo diseñado especialmente para antisentido de ApoA1 DA327409ext, todo por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) utilizando el termociclador Mx4000 (Stratagene). El nivel de cambio en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferencia de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada. Se realizó ELISA utilizando el kit MabTech Inc. ELISA ApoA1 cat # 3710-11-6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados se muestran en las Figs. 2, 3, 4 y 5. La Fig. 2 muestra que tanto los oligonucleótidos con la estructura de fosfoato, es decir, los enlaces internucleótidos como los oligonucleótidos de LNA fueron efectivos para modular la expresión del gen diana medida por el ARNm de ApoA1 (panel superior) y las cantidades de ARN de DA327409ext antisentido de ApoA1 (panel inferior) detectadas. La Fig. 3 muestra los niveles de ARN de DA327409ext antisentido natural de ApoA I (primera barra de cada par, sin relleno), y de ARNm de ApoAI (segunda barra de cada par, con relleno) en células HepG2 tratadas con oligonucleótidos diseñados contra DA327409ext. La Fig. 4 muestra la regulación positiva dependiente de la dosis de ARNm de ApoAI (panel inferior) y proteína (panel superior) en cultivos de HepG2 tratados con oligonucleótidos diseñados 5 contra DA327409ext. La Fig. 5 muestra la regulación positiva del ARNm de ApoA I en hepatocitos primarios del mono verde africano después del tratamiento con oligonucleótidos diseñados contra DA327409ext.

55 **Ejemplo 4: Estudio de la eficacia y duración de la acción de CUR-962 en el mono verde africano**

El objetivo de este estudio fue evaluar y comparar el efecto de la inactivación antisentido de las secuencias antisentido no codificantes discordantes que regulan los genes APOA1 después de la administración intravenosa en un modelo de primate no humano. Los artículos de prueba de oligonucleótidos antisentido diseñados para inhibir las secuencias reguladoras de APOA1 se designaron como CUR-962.

CUR-962: +G*+C*T* A*G*T* C*T*G* +T*+T*+G (SEQ ID NO:170).

CUR-963 (control): +G*+T*C* T*G*A* T*G*G* +A*+G*+A (SEQ ID NO:171).

5 DIRECTRICES REGULADORAS DE PRUEBAS

Este estudio se diseñó de acuerdo con principios toxicológicos aceptados y para cumplir con las directrices tripartitas armonizadas de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) (estudios de seguridad no clínicos para la realización de ensayos clínicos en seres humanos para productos farmacéuticos ICH M3 (m), 9 de noviembre de 2000), y procedimientos generalmente aceptados para la prueba de agentes terapéuticos.

ARTÍCULOS DE PRUEBAS Y CONTROL

Prueba de identidad y preparación del artículo

15 El artículo de prueba, CUR-962, es un oligonucleótido antisentido químicamente estabilizado. El vehículo para el suministro intravenoso es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Caracterización de vehículos

20 Para el vehículo PBS, la composición, el número de lote, la fecha de caducidad y las condiciones de almacenamiento (temperatura y luz/oscuridad) se obtuvieron del proveedor.

Prueba de almacenamiento y manipulación de artículos

25 La sustancia de prueba y el vehículo se almacenaron de acuerdo con las condiciones de almacenamiento recibidas proporcionadas por el patrocinador y el fabricante, en consecuencia.

Análisis de las formulaciones del artículo de prueba

30 Las muestras de la formulación del artículo de prueba se crioconservarán para el análisis de la concentración, la estabilidad y la homogeneidad de las formulaciones de la sustancia de prueba.

SISTEMA DE PRUEBAS DE RACIONALIZACIÓN

35 El primate es una especie adecuada no roedora, aceptable para las autoridades reguladoras como un indicador de peligros potenciales, y para la cual se dispone de exhaustivos datos de antecedentes. El mono verde africano específicamente es un modelo altamente relevante clínicamente de múltiples estados fisiológicos y patológicos humanos.

40 La vía de administración intravenosa corresponde a una posible vía terapéutica humana. La dosis de los artículos de prueba se basó en los resultados de los estudios de búsqueda de dosis de compuestos análogos realizados previamente en el mono verde africano.

45 Se eligió el mono verde africano como el primate de elección, ya que la secuencia diana de las sustancias de prueba se conserva en todas las especies con el 100 % de homología en primates. Además, la sustancia de prueba es un oligonucleótido sintético. En consecuencia, la dosificación en primates permite una evaluación superior de la eficacia de estos compuestos que reflejaría más la captación que probablemente se observará en seres humanos que en cualquier otra especie.

50

ANIMALES

Especie

55 *Chlorocebus sabaeus*, primate no humano

Raza

Mono verde africano originario de St Kitts.

60

Fuente

RxGen, Lower Bourryeau, St. Kitts, Indias Occidentales.

5 **Edad esperada**

Los animales de prueba eran adultos.

Peso corporal esperado

10

Los monos pesan aproximadamente 3-4 kg. El intervalo real puede variar, pero se documentará en los datos.

Sexo

15 Los animales de prueba eran hembras adultas.

Número de animales

20 Se seleccionaron diez animales para asegurar la identificación de 8 animales adecuados para la inclusión en el estudio.

Número en estudio

Hembras:8

25

Justificación para el número en estudio

30 Este estudio se diseñó para utilizar el menor número posible de animales, de acuerdo con el objetivo principal de evaluar la eficacia terapéutica del artículo de prueba en el mono verde africano y los estudios previos de la administración sistémica de este tipo de oligonucleótido en esta especie.

Especificación de animales

35 Se emplearon en el estudio diez monos verdes africanos adultos en el intervalo de peso de 3 a 4 kg. Los monos eran animales adultos que no habían consumido fármacos y que habían sido atrapados por la población salvaje que habita la isla. Los monos atrapados fueron tratados con antihelmínticos para eliminar cualquier posible carga parasitaria intestinal y se observaron en cuarentena durante un mínimo de 4 semanas antes de la selección para la inclusión en el estudio. La edad de los monos atrapados se estimó por tamaño y dentación, con la exclusión de los animales más viejos del estudio. Antes de la inclusión en el estudio, se realizó un examen clínico en cada mono, incluida la evaluación de la locomoción y la destreza. Se tomaron muestras de sangre y se enviaron a Antech
40 Diagnostics (Memphis, TN) para obtener datos químicos clínicos completos y un hemograma completo y perfiles de lípidos (véase las especificaciones en las secciones 9. 2 y 319567928). Los monos con valores de laboratorio anormales, de acuerdo con lo determinado en comparación con el intervalo normal establecido para los monos en la colonia de St. Kitts, se excluyeron del estudio. Para identificar 8 monos que satisfacen este criterio, se cribaron 10
45 monos, con el cribado de animales adicionales conforme sea necesario. Antes de iniciar el estudio, los monos seleccionados serán transferidos a jaulas individuales para que se aclimaten a los alojamientos individuales durante un período de una semana. Solo los animales considerados adecuados para la experimentación serán incluidos en el estudio. Los intervalos reales (o estimados) de edad y peso al inicio del estudio se detallarán en los datos sin procesar y en el informe final.

50

Sanidad y bienestar animal

Se siguieron los patrones más altos de bienestar animal y se respetaron las directrices estipuladas por el Departamento de Agricultura de St. Kitts y los Estados Unidos. Departamento de Salud y Servicios Humanos Todos
55 los estudios se realizarán de acuerdo con estos requisitos y todos los códigos de práctica aplicables para el cuidado y alojamiento de animales de laboratorio. Todos los patrones aplicables para el cuidado, operación y revisión veterinarios, tal como los contenidos en la guía de NIH para el cuidado y uso de animales. Las instalaciones de St. Kitts mantienen un comité de investigación con animales que revisa los protocolos e inspecciona las instalaciones de acuerdo con lo exige la guía. La fundación tiene una garantía aprobada depositada ante la oficina de bienestar de
60 los animales de laboratorio, de acuerdo con lo requiere la guía, # A4384-01 (fundación de investigación

axion/fundación biomédica de St. Kitts). No hay problemas especiales de atención veterinaria de primates no humanos ni problemas de riesgo biológico planteados por la investigación especificada en este estudio.

Alojamiento y medio ambiente

5 Para permitir la detección de cualquier signo clínico relacionado con el tratamiento, los animales se alojaron individualmente antes de la cirugía y después de la operación hasta el sacrificio. El edificio de primates donde estaban situadas las jaulas individuales se iluminó completamente con luz ambiental, que a 17 grados de latitud norte se aproxima a un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas:12 horas, de acuerdo con lo recomendado en EE. UU. 10 directrices del DHHS estadounidense. El edificio de primates RxGen estaba completamente ventilado hacia el exterior. Los ventiladores de techo aseguraron un movimiento de aire adicional para mantener una temperatura diana constante de 23-35 °C, como es típico de St. Kitts durante todo el año. Veinticuatro horas extremas de temperatura y humedad relativa (que tampoco se controlarán) se midieron diariamente. Durante el estudio, las jaulas se limpiaron a intervalos regulares.

15

Dieta y agua

A cada animal se le ofrecieron aproximadamente 90 gramos por día de una dieta estándar de chow de mono (TekLad, Madison, WI). Se registró la composición nutricional específica de la dieta. El agua fue analizada 20 periódicamente para la pureza microbiológica. Los criterios para los niveles aceptables de contaminantes en la dieta común y el suministro de agua estaban dentro de las especificaciones analíticas establecidas por el fabricante de la dieta y las evaluaciones periódicas de agua en las instalaciones, respectivamente. El agua cumplió con todos los criterios necesarios para la certificación como aceptable para el consumo humano.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Identificación y aleatorización de animales

La asignación se realizó mediante un procedimiento de aleatorización estratificado basado en el peso corporal y los 30 perfiles de colesterol en plasma. Antes y después de la asignación a un grupo, cada animal fue identificado por un tatuaje en el abdomen. Los tatuajes se colocan en todos los animales de la colonia como un medio de identificación en el curso de las inspecciones de salud habituales. Se elaboró un plan de jaula para identificar a los individuos alojados en el interior, y los monos individuales se identificaron aún más mediante una etiqueta marcada en su jaula respectiva.

35

Tamaños de grupos, dosis y números de identificación.

Los animales fueron asignados a 2 grupos de tratamiento, compuestos por 4 monos en cada grupo. Se proporcionaron números de identificación de animales específicos a cada mono de acuerdo con el sistema de 40 numeración de las instalaciones. Este sistema identifica de forma única a cada mono mediante una letra seguida de un número de tres dígitos, por ejemplo, Y032.

Vía y frecuencia de administración

45 Los animales recibieron dosis una vez al día en los días 1, 3 y 5, suministrados por vía intravenosa mediante infusión manual durante aproximadamente ~10 min. La velocidad de infusión será de 24 ml/kg/h. Los animales se sedaron con ketamina y xilazina antes y durante el procedimiento de dosificación. Se insertó un catéter venoso (equipo de infusión de venas Terumo mini, aguja de calibre 20 o equipo de infusión adecuado similar) en la vena safena. La dosificación se realizó en cada mono entre las 8:00 y las 10:00 am, poco después de que los animales se 50 despertaran y antes de la alimentación. Se recogió una muestra de sangre para evaluar el colesterol en plasma y otros niveles de lípidos como se describe en la sección de química de la sangre a continuación, justo antes de cada infusión. La recogida de sangre precedió a la alimentación a ambos intervalos de muestreo para minimizar los efectos dietéticos en las mediciones de colesterol.

Observaciones clínicas

Todos los signos visibles de reacción al tratamiento se registraron en cada día de dosificación. Además, los animales fueron examinados al menos una vez a la semana en busca de atributos físicos como el aspecto y el estado general.

60

Pesos corporales

Los pesos corporales se registraron a intervalos semanales durante los períodos de tratamiento y postratamiento.

5 Consumo de alimentos

El consumo individual de alimentos no fue cuantificado. Sin embargo, los patrones de alimentación se monitorearon y se hizo una nota de cualquier cambio importante.

10 Mortalidad y morbilidad

Se registrará la mortalidad y la morbilidad. Cualquier decisión con respecto al sacrificio prematuro se tomará después de consultar con el director del estudio y con el científico de monitoreo del patrocinador, si es posible. Los animales que se encuentren muertos o muertos prematuramente se someterán a una necropsia con la recogida de tejidos de hígado, riñón, corazón, bazo y pulmón para histopatología. En caso de un sacrificio prematuro, también se tomará una muestra de sangre (si es posible) y se determinarán los parámetros. Los animales que se encuentren muertos después de las horas normales de trabajo se refrigerarán durante la noche y se realizarán las necropsias al comienzo del siguiente día laborable. Si el estado de un animal requiere un sacrificio prematuro, será sacrificado por una sobredosis intravenosa de pentobarbital de sodio. Toda investigación se rige por los principios para el uso de animales. RxGen está obligado por ley a cumplir con las normas del Departamento de Salud y Servicios Humanos estadounidense para las instalaciones de primates, que dictan los niveles de gravedad que deben cumplir los procedimientos dentro de este estudio, especificados como leves, deben cumplirse.

ESTUDIOS DE LABORATORIO CLÍNICO

25

Muestras de sangre

Se obtuvieron tres muestras de sangre de todos los animales antes del tratamiento, para establecer un valor de referencia de colesterol en plasma. Las muestras de sangre se recogieron después del tratamiento y se tomaron mediante venopunción superficial. El volumen recogido en cualquier momento de muestreo no debía superar los 8 ml, lo que representa aproximadamente el 4 % del volumen total de sangre de un mono adulto.

A los animales se les extrajo sangre en dos momentos del período inicial y en los días de estudio 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15, con una recogida ~ semanal continuada hasta que el colesterol total en plasma se normalice en el grupo 1 (APOA1), si se aprecia una perturbación. Se recogieron ocho mililitros de sangre los días 1, 6 y 11 para permitir la evaluación de la química clínica, los perfiles lipídicos y los perfiles de coagulación. En todos los demás días, solo se recogieron 5 ml de sangre, suficiente para la química clínica y los perfiles lipídicos.

Las muestras de sangre se dividieron en tres partes en los días donde se realizarán las medidas químicas y hematológicas. Se recogió una muestra en tubos de recogida de plasma que contenían 25 µl de heparina y se etiquetó con el número del estudio, el nivel de dosis, el número del día, la fecha y el número único de identificación del animal. Después de la separación, se retiró 1 ml de plasma a un criotubo estéril que llevaba los detalles anteriores y se almacenó adecuadamente hasta el envío, para el análisis químico de la sangre. Una parte alícuota del plasma (0,5 ml) se retiró a un criotubo estéril etiquetado con los detalles descritos anteriormente y se almacenó adecuadamente hasta el envío para la distribución de colesterol en plasma y el análisis de apolipoproteínas. Se congelaron instantáneamente partes alícuotas adicionales de 1 ml y 0,5 ml de plasma y se almacenaron en nitrógeno líquido para servir como muestras de respaldo para posibles análisis adicionales.

Se trataron dos partes alícuotas adicionales de muestra de sangre completa (2,5 ml cada una) con anticoagulante citrato ácido de dextrosa (ACD) y se etiquetaron, y se almacenaron a 4 °C hasta que se enviaron para coagulación y las medidas de CBC se detallan a continuación.

Las muestras se enviaron para que llegaran dentro de las 24 h del muestreo, o se almacenaron en condiciones estables para su envío en el momento que se determine adecuado.

55

Se tomaron muestras repetidas solo si se pensaba que el procedimiento de muestreo o el procedimiento de ensayo estaban fuera de los límites de calidad normales. Las muestras fueron tomadas en tubos etiquetados.

60

Hematología

Se midió un hemograma completo (CBC), tiempo de protrombina, PTT, fibrinógeno y dímero D en todas las muestras recogidas en los días 1, 6 y 11 (y en días adicionales si se detectan perturbaciones en cualquiera de estos momentos). Los hemogramas se evaluaron en 1 ml de sangre completa recogida en vacutainers que contienen EDTA. Las determinaciones del perfil de coagulación se realizaron en aproximadamente 2,0 ml de sangre recogida en vacutainers que contienen anticoagulante de citrato ácido de dextrosa (ACD).

Química de la sangre

Glucosa, nitrógeno de urea en sangre, creatinina, proteína total, albúmina, bilirrubina total, fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), colesterol, calcio, fósforo, sodio, potasio, clorhidrato, A/G, BUN/creatinina (calculada) globulinas (calculadas), lipasa, amilasa, triglicéridos, CPK, lactato deshidrogenasa, gamma glutamil transferasa (GGT), magnesio, colesterol total LDL, VLDL, HDL, ApoA1, ApoA2, ApoB, ApoE, ApoLp(a). Se realizaron mediciones de superquímicas y LDL y HDL en cada muestra de plasma. Las medidas de apolipoproteínas se realizaron en muestras seleccionadas después de la evaluación de los datos de LDL y HDL.

Las determinaciones se realizaron en aproximadamente 1,0 ml de plasma para la superquímica y 0,5 ml de plasma para la distribución de colesterol y las medidas de alipoproteína. Se recogió y almacenó una parte alícuota adicional de plasma para posibles análisis futuros.

20 Biopsias de hígado

Se realizó una biopsia percutánea de hígado en todos los monos al inicio del estudio y en los días 7 y 17. Se empleará una aguja de biopsia de calibre 14 (INRAD) para obtener 2 biopsias centrales (~1,0 cm de longitud) del lóbulo derecho e izquierdo del hígado. La biopsia exitosa se confirmó mediante la inspección visual de la muestra de biopsia en la aguja de biopsia antes de subdividir como se indica a continuación.

Las muestras se agruparon y a continuación se dividieron de la siguiente manera. La mitad de una biopsia (~0,5 cm) del lóbulo izquierdo se sumergió en paraformaldehído para la sección de histopatología y análisis *in situ*. La mitad restante de cada una de las biopsias divididas, así como las otras dos biopsias intactas, se sumergieron inmediatamente en un criotubo etiquetado que contenía 2 ml de RNAlater (Qiagen) y se incubaron a 4 °C durante la noche, después de lo cual se aspiró el RNAlater y el tubo de muestra se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido. Después del transporte en nitrógeno líquido, se aisló el ARN total empleando el procedimiento Trizol o TriReagent, con un rendimiento esperado de ~40 µg por 1,0 cm 14 g de biopsia central (~80-100 µg total para el ARN combinado derivado de las 4 biopsias de núcleo agrupadas de un solo mono, ausente el componente guardado para histopatología e *in situ*). Se utilizaron 5 µg de la fracción de ARN para la qPCR en tiempo real específica de diana (ensayo de miARN TaqMan, ABI). La fracción de ARN restante se reservó para un posible análisis de la expresión del genoma.

El tejido fijado se procesó para la inclusión en parafina. Las secciones se tiñeron para H&E y los hallazgos histopatológicos informados bajo los hallazgos histológicos brutos. Todas las diapositivas generadas en este trabajo llevaban una etiqueta con el número de estudio, nivel de dosis, número de día, fecha y número de identificación único del animal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

45

Estadísticas

Se realizaron estadísticas descriptivas sobre hematología, química clínica y perfiles lipídicos. Se realizaron análisis bioinformáticos adecuados sobre los datos de expresión.

50

Tamaño de la muestra

Las determinaciones del tamaño de la muestra se realizaron sobre la base de experimentos previos que administraron los oligonucleótidos antisentido modificados a monos verdes africanos y la química clínica resultante y los cambios en el perfil lipídico y la variabilidad asociada. El número total de sujetos para la evaluación de la eficacia fueron veinte animales incluidos, con cuatro animales por grupo de tratamiento y cuatro animales seleccionados adicionales.

60

Resultados:

Los resultados se muestran en las siguientes figuras. Figura 6: Los niveles de ARNm de ApoA1 (paneles superiores) y proteína (paneles inferiores) aumentaron en las biopsias de hígado de mono después del tratamiento con CUR-962, un oligonucleótido diseñado para DA327409ext antisentido de ApoA1, en comparación con los niveles de referencia, de acuerdo con lo determinado por PCR en tiempo real y ELISA respectivamente (los dos paneles de la izquierda). Los niveles de ARNm de ApoA1 y proteína no cambiaron después del mismo período de tiempo en el grupo de control que recibió una dosis de un oligonucleótido que no mostró ningún efecto sobre los niveles de ApoA1 in vitro (CUR-963, los dos paneles de la derecha).

Además, aunque se ha descrito una característica particular de la invención con respecto a solo una de varias implementaciones, dicha característica puede combinarse con una o más de otras características de las otras implementaciones, ya que puede desearse y ser ventajoso para cualquier aplicación dada o particular.

El resumen de la descripción permitirá al lector determinar rápidamente la naturaleza de la descripción técnica. Esta se presenta con el entendimiento de que no se usará para interpretar o limitar el alcance o el significado de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de apolipoproteína A1 para su uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión de una apolipoproteína A1 y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO:2.
2. Un oligonucleótido que se dirige a una transcrito antisentido natural de apolipoproteína A1 para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a apolipoproteína A1, donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión de una apolipoproteína A1 y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO:2.
3. Uso de un oligonucleótido que se dirige a una transcrito antisentido natural de apolipoproteína A1 para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a apolipoproteína A1, donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión de una apolipoproteína A1 y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO:2.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 o el oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades o trastornos neurológicos, enfermedades o trastornos asociados con apolipoproteínas, lipoproteínas de alta densidad, colesterol, colesterol alto, relaciones HDL/LDL, artritis, enfermedad cardíaca, enfermedad de Tángr, amiloidosis no neuropática sistémica, otras enfermedades amiloides, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, diabetes, inflamación, enfermedades autoinmunes, cáncer, obesidad, aterosclerosis, inhibición del crecimiento tumoral dependiente de la angiogénesis y de la disminución de los vasos sanguíneos existentes formados por tumores, enfermedades no cancerosas cuyos síntomas incluyen un aumento en la angiogénesis, por ejemplo, retinopatía del prematuro, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, artritis reumatoide y psoriasis.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4 o el oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre trastornos cardiovasculares y enfermedades y trastornos neurológicos.
6. Un procedimiento *in vitro* para aumentar la expresión de apolipoproteína A1 en células o tejidos de pacientes que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de apolipoproteína A1; aumentando de este modo la expresión de apolipoproteína A1 y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO:2.
7. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de apolipoproteína A1, donde el oligonucleótido aumenta la expresión de una apolipoproteína A1 y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO:2.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 5, o el oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 5, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 7, donde el oligonucleótido tiene entre 10 y 30 nucleótidos de longitud.
9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 u 8, o el oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5 u 8, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, donde el oligonucleótido tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con un complemento del transcrito antisentido natural de la apolipoproteína A1.
10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, 8 o 9, o el oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 8 o 9, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6, 8 o 9, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el oligonucleótido es monocatenario.
11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 u 8 a 10, o el oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5, u 8 a 10, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8 a 10, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde el oligonucleótido comprende al menos uno de las SEQ ID NO:159-161, 170 y 173.

12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, o el oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 11, donde el oligonucleótido comprende la SEQ ID NO:170.
- 5
13. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 u 8 a 12, o el oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5 u 8 a 12, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8 a 12, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, donde la expresión de apolipoproteína A1 se incrementa en al menos un 10 %.
- 10
14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 u 8 a 13, o el oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5 u 8 a 13, o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8 a 13, o el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, donde el oligonucleótido comprende además una o más modificaciones que comprenden:
- 15
- a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'-O-metoxietilo (MOE), 2'-fluoro, alquifosfonato, fosforoditioato, alquifosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
- 20
- b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
- c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de
- 25
- azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
15. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

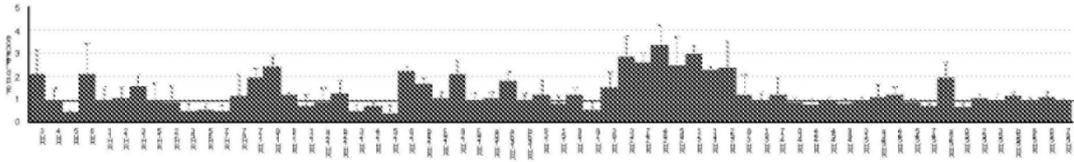


FIGURA 1

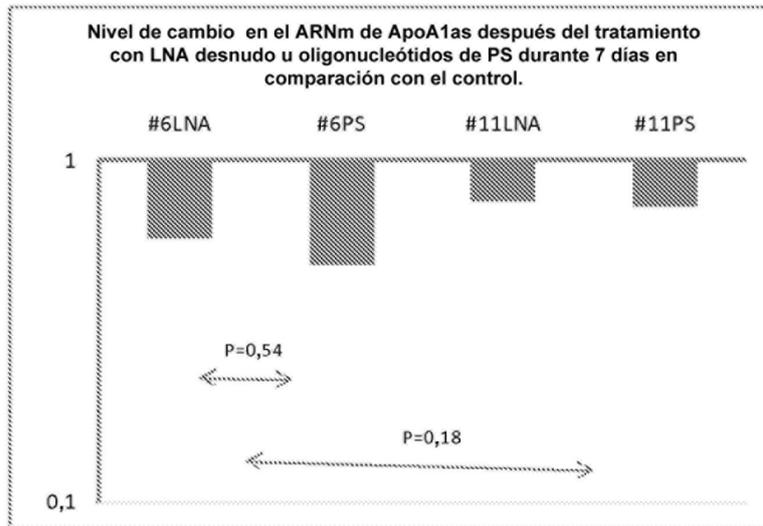
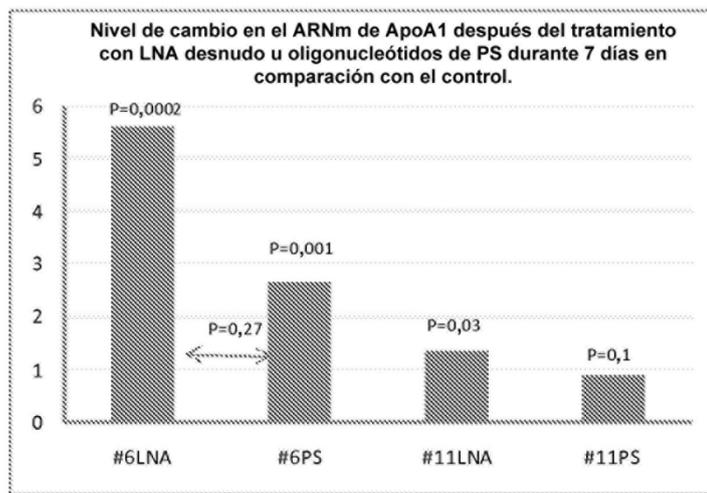


FIGURA 2

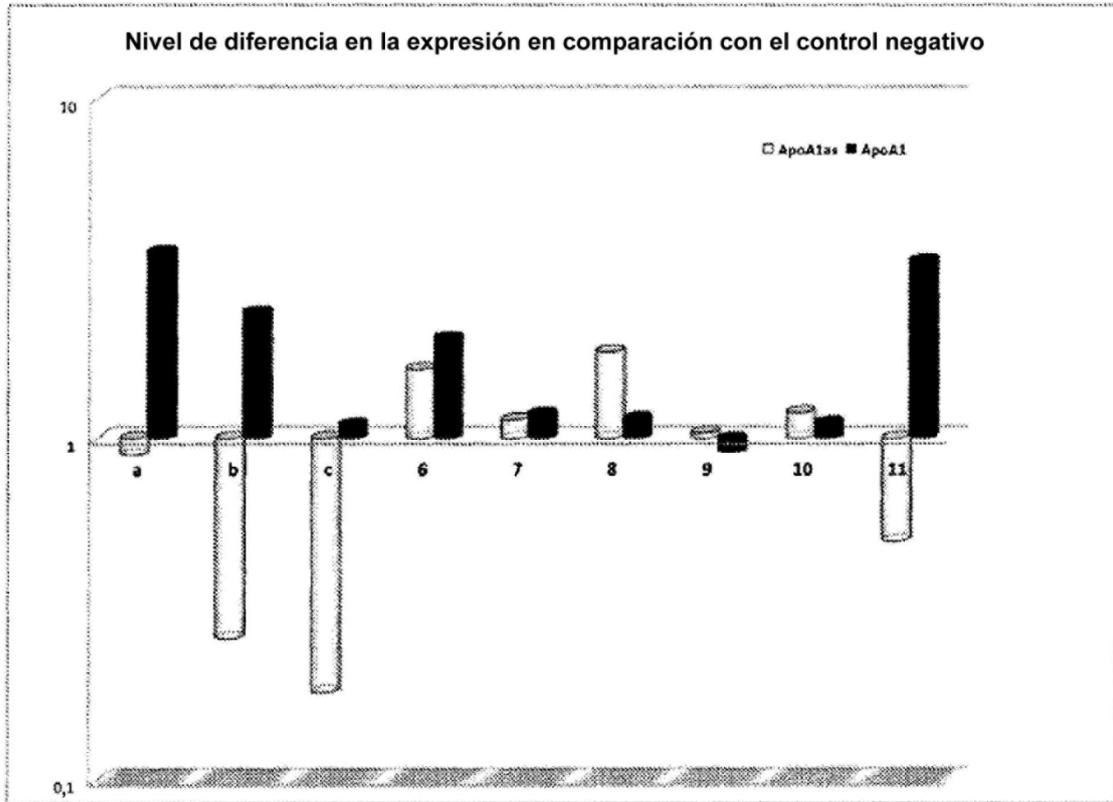


FIGURA 3

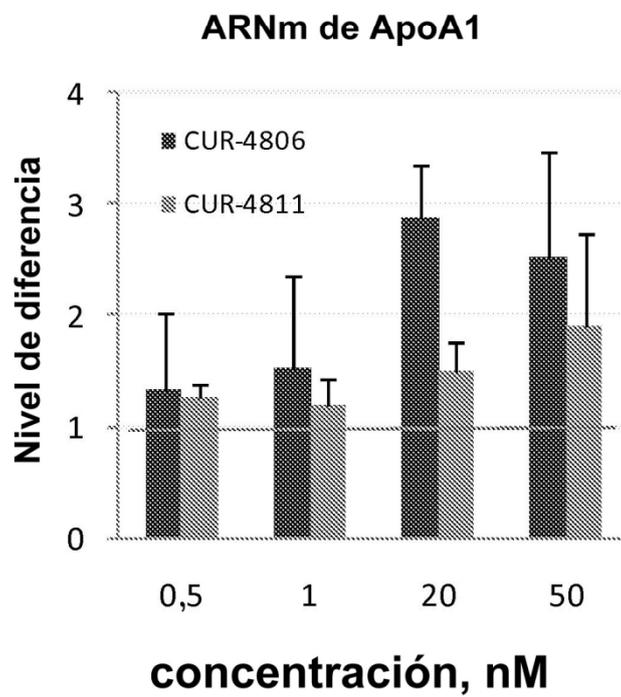
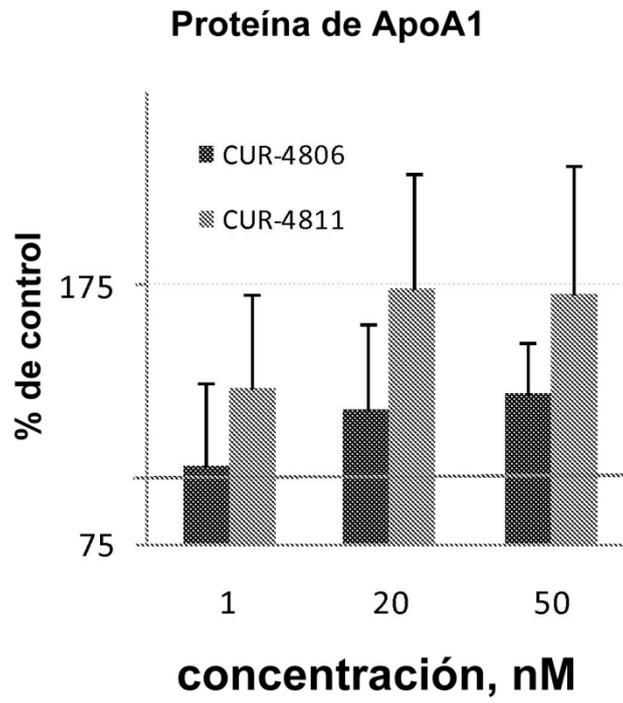


FIGURA 4

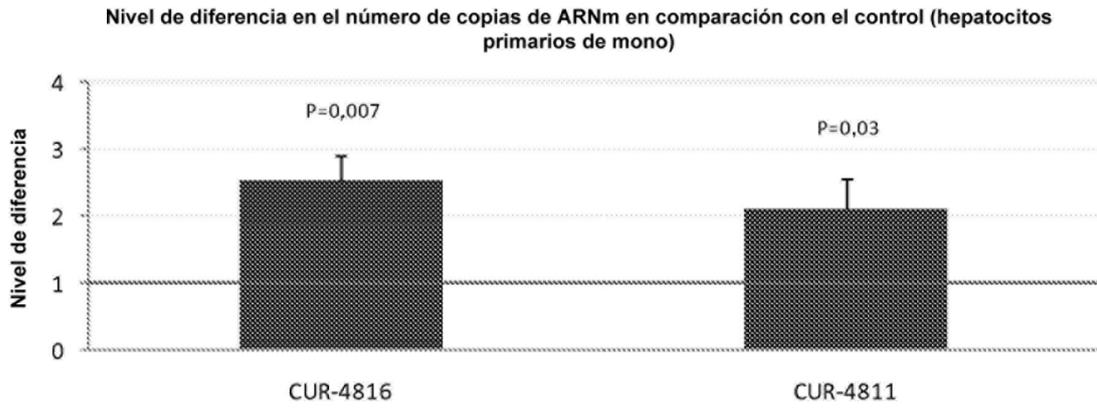


FIGURA 5

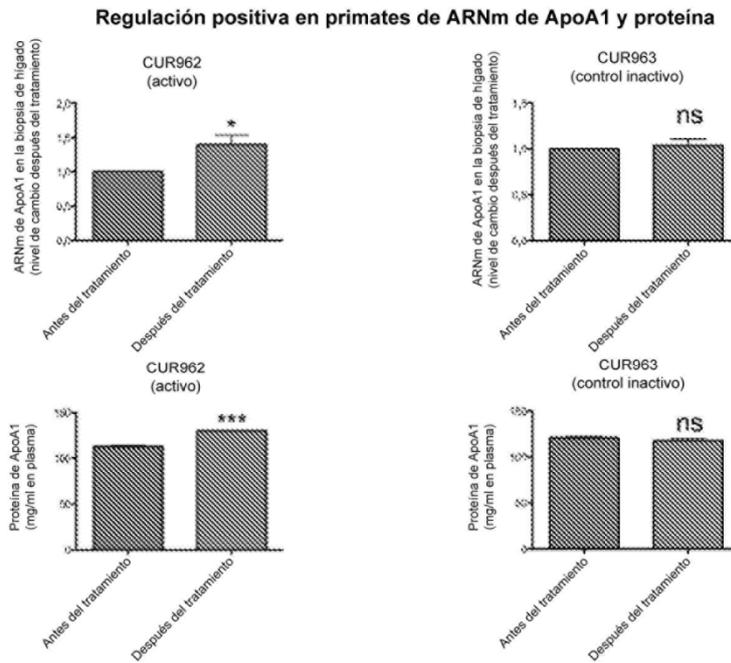


FIGURA 6

FIGURA 7

(SEQ ID NO: 1)

>gi|4557320|ref|NM_000039.1|ARNm de apolipoproteína A1 (APOA1) de homo sapiens
AGAGACTGCGAGAAGGAGGTCCCCACGGCCCTTCAGGATGAAAGCTGCGGTGCTGACCTGGCCGTGCT
CTTCTGACGGGGAGCCAGGCTCGGCATTTCTGGCAGCAAGATGAACCCCCAGAGCCCTGGGATCGA
GTGAAGGACCTGGCCACTGTGTACGTGGATGTGCTCAAAGACAGCGGCAGAGACTATGTGTCCCAGTTTG
AAGGCTCCGCTTGGGAAAACAGCTAAACCTAAAGTCCTTGACAACCTGGGACAGCGTGACCTCCACCTT
CAGCAAGCTGCGCGAACAGCTCGGCCCTGTGACCCAGGAGTTCTGGGATAACCTGGAAAAGGAGACAGAG
GGCTGAGGCAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAGCCCTACCTGGACGACT
TCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAGATGGAGCTTACC GCCAGAAGGTGGAGCCGCTGCGCGCAGAGCTCCA
AGAGGGCGCGGCCAGAAGCTGCACGAGCTGCAAGAGAAGCTGAGCCCACTGGGCGAGGAGATGCGCGAC
CGCGCGCGCCCATGTGGACGCGCTGCGCACGCATCTGGCCCCCTACAGCGACGAGCTGCGCCAGCGCT
TGCCCGCGCGCCTTGAGGCTCTCAAGGAGAACGGCGCGCCAGACTGGCCGAGTACCACGCCAAGGCCAC
CGAGCATCTGAGCACGCTCAGCGAGAAGGCCAAGCCCGCGCTCGAGGACCTCCGCCAAGGCCCTGTGCC
GTGCTGGAGAGCTTCAAGGTGAGCTTCTGAGCGCTCTCGAGGAGTACACTAAGAAGCTCAACACCCAGT
GAGGCGCCCGCGCCGCCCTTCCCGGTGCTCAGAATAACGTTTCCAAAGTGGG

(SEQ ID NO: 1a)

aggaccagtg agcagcaaca gggccggggc tggccttalc agctcccag 116213599
cccagacct ggetcagac afaatagc cctgcaagag ctgctgctt 116213549
AGAGACTGCG AGAAGGAGgt gctctgct gcctgcccc gtcacttgg 116213499
ctccccagct caaggttcag gccctgcccc agggcgggccc tctgggtacc 116213449
tgggtcttc tcccctctg tgccctctc ctacactggc tgcattgagt 116213399
ggggagcac gggctctg catgctgaag geacccaact cagccaggcc 116213349
cttctctc tccagGTCCC CCACGGCCCT TCAGGATGAA AGCTGCGGTG 116213299
CTGACCTTGG CCGTGCTCTT CCTGACGGgt aggtgcccc taactaggg 116213249
agccaacct cgggggctt tctcctaaa tccccgtggc ccacctct 116213199
gggcagaggg agcaggttct tcactgccc cctctcccc acctccaagc 116213149
ttggcttct ggtcagatc ttagccaca gctggctga tctgggtctc 116213099
cccctccc ctcagGGAGC CAGGCTCGGC ATTTCTGGCA GCAAGATGAA 116213049
CCCCCCCAGA GCCCTGGGA TCGAGTGAAG GACCTGGCCA CTGTGTACGT 116212999
GGATGTGCTC AAAGACAGCG GCAGAGACTA TGTGTCCCAG TTTGAAGGCT 116212949
CCGCCTTGGG AAAACAGCTA AAgtaaggac ccagcctggg gttgaggca 116212899
gggttagggg gcagagcct ggggatgat gttgaagcca gactgcccga 116212849
gtctcact aatatctgat gagetggccc ccacagatgg tctggatga 116212799

ES 2 727 549 T3

gaaactgga tgggatctcc aggcagggtc acageccatg tcccctgcaa 116212749
aggacagacc agggctgccc gatgctgat cacagagcca cattgtcct 116212699
gcaagtgtag caagcccctt tccctette accacctct etgetctgc 116212649
ccagcaagac tgfgggctgt ctccggagag gagaatgctc tggaggcata 116212599
gaagcgaggt cctcaaggg cccacttgg agaccaact aactgggca 116212549
tagtcccagc tctctctct ttttagctcc tctctgtcc tccgtccagc 116212499
tgcacaacgg ggcctggcct ggcggggcag ggggttggg tgagagtga 116212449
ctggaatgc taggccaactg cactccgag gacaggtgc acccagggt 116212399
cacccctgat aggcggggc gctggaggc cagccctcaa cctctctgc 116212349
tcacctcca gCCTAAAGCT CCTTGACAAC TGGGACAGCG TGACCTCCAC 116212299
CTTCAGCAAG CTGCGCGAAC AGCTCGGCC TGTGACCCAG GAGTTCTGGG 116212249
ATAACCTGGA AAAGGAGACA GAGGCCTGA GGCAGGAGAT GAGCAAGGAT 116212199
CTGGAGGAGG TGAAGGCCAA GGTGCAGCCC TACCTGGACG ACTTCCAGAA 116212149
GAAGTGGCAG GAGGAGATGG AGCTTACCG CCAGAAGGTG GAGCCGCTGC 116212099
GCGCAGAGCT CCAAGAGGGC GCGCGCCAGA AGCTGCACGA GCTGCAAGAG 116212049
AAGCTGAGCC CACTGGGCGA GGAGATGCGC GACCGCGCGC GCGCCCATGT 116211999
GGACGCGCTG CGCACGCATC TGGCCCCCTA CAGCGACGAG CTGCGCCAGC 116211949
GCTTGGCCGC GCGCCTTGAG GCTCTCAAGG AGAACGGCGG CGCCAGACTG 116211899
GCCGAGTACC ACGCCAAGGC CACCGAGCAT CTGAGCACGC TCAGCGAGAA 116211849
GGCCAAGCCC GCGCTCGAGG ACCTCCGCCA AGGCCTGCTG CCCGTGCTGG 116211799
AGAGCTTCAA GGTCAGCTC CTGAGCGCTC TCGAGGAGTA CACTAAGAAG 116211749
CTCAACACCC AGTGAGGCGC CCGCCGCCGC CCCCCTTCCC GGTGCTCAGA 116211699
ATAAACGTTT CCAAAGTGGG aagcagctc tttctttgg gagaatagag 116211649
gggggtcgg ggacatccg gggagcccgg gtggggcctt tggcctgga 116211599
gcagggaact cctgccgat

FIGURA 7 (CONTINUACIÓN)

Secuencia antisentido natural (DA327409 extendido) (SEQ ID NO:2).

CAGCTTCTCTTGCAGCTCGTGCAGCTTCTGGCGCGCGCCCTCTTGGAGCTCTGCGC
GCAGCGGCTCCACCTTCTGGCGGTAGAGCTCCATCTCCTCCTGCCACTTCTTCTGG
AAGTCGTCCAGATCCAAATGGCAAACCTTCTTCATCCACCAGGACCCAACCCACA
GGCTACTTATTGCTGGAAACCTACGTTGTTCCCTTGGATTGAAGTAATCTCTCCCTCt
TCTGGTGCGCCACAGCACTTGCACCAACAGTGGGTACcCAACAGACTAGCGTGC
CTGCCGAAGAAGGGTCTCTGACAATCAGGGGACAATGGGGAATTATGCTCTCC
AGACTTTCTACACACACAAGTCACACAGGAAGGAAGGTAAAGAGAACTAGAGA
AAATAATTTTTGAAGAAAAACATTTAGGAAGTATTGAAAGTACACGGTAACTCA
GCCTGGGGCAGGGGTGGAGGGCAGCAGCACTGTTTGCTGCAGCTATGCTCCTTCC
TCAGTGCCCTGCACACCCGGGACTTGCTCGGTGAGCATCTCTCGTGTGAGTGACA
GCTAGTGTGAGTACTCTTATGTTTCAGCTGCCCTGACTACCTCTTGACTTTGGGGA
CAAGTTACTTAATCTCTGTGCCTCCGCTGTTTCACTGGTAAATGGGAATAAGAGTT
GGTTATTCTAGGGTTGTAGGGTTGTTGTAAGGATTAATGAATCCGTATGTGAAC
AGCATTTGGTGCCTGGCACATGTGAGCTCAGCCGGGCGCGGTGGCTCATGCCTGT
AATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCGTGC GGATCACGAGGTCAGGAGATCGA
GACCATCCTGGCTAACACGGTGAAACCCTGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTA
NCGGGGCGTGNTGGNGGGACATGTAGTCCCNGCTACTCGGGNNGCTGA

FIGURA 8

TGGAGCTCAGTTT (SEQ ID NO: 3)
TTTCTCGTGCAGCT (SEQ ID NO: 4)
TTCTGGCGCGTGCC (SEQ ID NO: 5)
CCCTCGTGGAGCTC (SEQ ID NO: 6)
GCCCCGCGCGCAGCG (SEQ ID NO: 7)
CGGCTCCACCTTCT (SEQ ID NO: 8)
CTGGCGGTAGAGCT (SEQ ID NO: 9)
GCTCGTGCAGCTTC (SEQ ID NO: 10)
CAGCTTCTGGCGCG (SEQ ID NO: 11)
GCGCGCAGCGGCTC (SEQ ID NO: 12)
TCCACCTTCTGGCG (SEQ ID NO: 13)
CGGTGTAGAGCTCC (SEQ ID NO: 14)
CCATCTCCTCCTGC (SEQ ID NO: 15)
GAAGTCGTCCAGATCCAAA (SEQ ID NO: 16)
AAGTCGTCCAGATCCAAAT (SEQ ID NO: 17)
AGTCGTCCAGATCCAAATG (SEQ ID NO: 18)
GTCGTCCAGATCCAAATGG (SEQ ID NO: 19)
TCGTCCAGATCCAAATGGC (SEQ ID NO: 20)
CGTCCAGATCCAAATGGCA (SEQ ID NO: 21)
GTCCAGATCCAAATGGCAA (SEQ ID NO: 22)
TCCAGATCCAAATGGCAA (SEQ ID NO: 23)
CAGATCCAAATG (SEQ ID NO: 24)
AGATCCAAATGGCAA (SEQ ID NO: 25)
AGATCCAAATGG (SEQ ID NO: 26)
GATCCAAATGGC (SEQ ID NO: 27)
ATCCAAATGGCA (SEQ ID NO: 28)
TCCAAATGGCAA (SEQ ID NO: 29)
CCAAATGGCAA (SEQ ID NO: 30)
CCAAATGGCAAACCTTCTT (SEQ ID NO: 31)
ATGGCAAATCTTCTTCATC (SEQ ID NO: 32)
AAATGGCAAACCTTCTTCA (SEQ ID NO: 33)
AAATGGCAAATCTTCTTCA (SEQ ID NO: 34)
ATGGCAAACCTTCTTCATC (SEQ ID NO: 35)
CCAAATGGCAAATCTTCTT (SEQ ID NO: 36)
ATGGCAAACCTTCTT (SEQ ID NO: 37)
ATGGCAAATCTTCTT (SEQ ID NO: 38)
CTTCTTCATCC (SEQ ID NO: 39)
CCAGGACCCAACCCACA (SEQ ID NO: 40)
GCTACTTATTGCTG (SEQ ID NO: 41)

FIGURA 9A

TGCTGGAAACCTAC (SEQ ID NO: 42)
TTCCTTGGATTGAA (SEQ ID NO: 43)
GCCCACAGCACTTGCA (SEQ ID NO: 44)
CACCAACAGTGGGTAC (SEQ ID NO: 45)
CAACAGACTAGC (SEQ ID NO: 46)
GAAGAAGGGGTCCT (SEQ ID NO: 47)
GAATTATGCTCTCC (SEQ ID NO: 48)
CTCCAGACTTTCTA (SEQ ID NO: 49)
AAGTCACACAGGAAGG (SEQ ID NO: 50)
GAAACTAGAGAAAA (SEQ ID NO: 51)
AATAATTTTTGAAG (SEQ ID NO: 52)
GAAGTATTGAAAGT (SEQ ID NO: 53)
TGAAAGTACACGGT (SEQ ID NO: 54)
CTGGGGCAGGGGTG (SEQ ID NO: 55)
GGGGTGGAGGGCAG (SEQ ID NO: 56)
TGCTCCTTCCTCAG (SEQ ID NO: 57)
ACCCGGGACTTGCTC (SEQ ID NO: 58)
TGTCAGTGACAGCT (SEQ ID NO: 59)
TGTCAGTGACAGCTAGTGT (SEQ ID NO: 60)
GTCAGTGACAGCTAGTGTG (SEQ ID NO: 61)
TCAGTGACAGCTAGTGTGA (SEQ ID NO: 62)
AGTGACAGCTAGTGTGAGT (SEQ ID NO: 63)
TGACAGCTAGTGTGA (SEQ ID NO: 64)
TGACAGCTAGTGTGAGTAC (SEQ ID NO: 65)
GACAGCTAGTGTGAGTACT (SEQ ID NO: 66)
CAGCTAGTGTGAGTACTCT (SEQ ID NO: 67)
AGCTAGTGTGAGTACTCTT (SEQ ID NO: 68)
GCTAGTGTGAGTACTCTTA (SEQ ID NO: 69)
CTAGTGTGAGTACTCTTAT (SEQ ID NO: 70)
CTAGTGTGAGTACT (SEQ ID NO: 71)
TAGTGTGAGTACTCTTATG (SEQ ID NO: 72)
AGTGTGAGTACTCTTATGT (SEQ ID NO: 73)
GTGTGAGTACTCTTATGTT (SEQ ID NO: 74)
TGTGAGTACTCTTATGTTT (SEQ ID NO: 75)
GTGAGTACTCTTATGTTCA (SEQ ID NO: 76)
TGAGTACTCTTATGTTTCA (SEQ ID NO: 77)
ACTCTTATGTTTCA (SEQ ID NO: 78)
TACCTCTTGACTTT (SEQ ID NO: 79)
GACTTTGGGGACAA (SEQ ID NO: 80)

FIGURA 9B

A*A*A*C*T*G*A*G*C*T*C*A (SEQ ID NO: 81)
A*G*C*T*G*C*A*C*G*A*G*A*A (SEQ ID NO: 82)
G*G*C*A*C*G*C*G*C*A*G*A*A (SEQ ID NO: 83)
G*A*G*C*T*C*A*C*G*A*G*G (SEQ ID NO: 84)
C*G*C*T*G*C*G*C*G*G*G*C (SEQ ID NO: 85)
A*G*A*A*G*G*T*G*G*A*G*C*C*G (SEQ ID NO: 86)
A*G*C*T*C*T*A*C*C*G*C*A*G (SEQ ID NO: 87)
G*A*A*G*C*T*G*C*A*C*G*A*G*C (SEQ ID NO: 88)
C*G*C*G*C*A*G*A*A*G*C*T*G (SEQ ID NO: 89)
G*A*G*C*C*G*C*T*G*C*G*C*G*C (SEQ ID NO: 90)
C*G*C*C*A*G*A*A*G*G*T*G*G*A (SEQ ID NO: 91)
G*G*A*G*C*T*C*T*A*C*A*C*C*G (SEQ ID NO: 92)
G*C*A*G*G*A*G*G*A*G*A*T*G*G (SEQ ID NO: 93)
T*T*T*G*G*A*T*C*T*G*G*A*C*G*A*C*T*T*C (SEQ ID NO: 94)
A*T*T*T*G*G*A*T*C*T*G*G*A*C*G*A*C*T*T (SEQ ID NO: 95)
C*A*T*T*T*G*G*A*T*C*T*G*G*A*C*G*A*C*T (SEQ ID NO: 96)
C*C*A*T*T*T*G*G*A*T*C*T*G*G*A*C*G*A*C (SEQ ID NO: 97)
G*C*C*A*T*T*T*G*G*A*T*C*T*G*G*A*C*G*A (SEQ ID NO: 98)
T*G*C*C*A*T*T*T*G*G*A*T*C*T*G*G*A*C*G (SEQ ID NO: 99)
T*T*G*C*C*A*T*T*T*G*G*A*T*C*T*G*G*A*C (SEQ ID NO: 100)
T*T*T*G*C*C*A*T*T*T*G*G*A*T*C*T*G*G*A (SEQ ID NO: 101)
C*A*T*T*T*G*G*A*T*C*T*G (SEQ ID NO: 102)
T*T*T*G*C*C*A*T*T*T*G*G*A*T*C*T (SEQ ID NO: 103)
C*C*A*T*T*T*G*G*A*T*C*T (SEQ ID NO: 104)
G*C*C*A*T*T*T*G*G*A*T*C (SEQ ID NO: 105)
T*G*C*C*A*T*T*T*G*G*A*T (SEQ ID NO: 106)
T*G*C*C*A*T*T*T*G*G*A*T (SEQ ID NO: 107)
T*T*T*G*C*C*A*T*T*T*G*G (SEQ ID NO: 108)
A*A*G*A*A*G*G*T*T*T*G*C*C*A*T*T*T*G*G (SEQ ID NO: 109)
G*A*T*G*A*A*G*A*A*G*A*T*T*T*G*C*C*A*T (SEQ ID NO: 110)
T*G*A*A*G*A*A*G*G*T*T*T*G*C*C*A*T*T*T (SEQ ID NO: 111)
T*G*A*A*G*A*A*G*A*T*T*T*G*C*C*A*T*T*T (SEQ ID NO: 112)
G*A*T*G*A*A*G*A*A*G*G*T*T*T*G*C*C*A*T (SEQ ID NO: 113)
A*A*G*A*A*G*A*T*T*T*G*C*C*A*T*T*T*G*G (SEQ ID NO: 114)
A*A*G*A*A*G*G*T*T*T*G*C*C*A*T (SEQ ID NO: 115)
A*A*G*A*A*G*A*T*T*T*G*C*C*A*T (SEQ ID NO: 116)
G*G*A*T*G*A*A*G*A*A*G (SEQ ID NO: 117)
T*G*T*G*G*G*T*G*G*G*T*C*C*T*G*G (SEQ ID NO: 118)
C*A*G*C*A*A*T*A*A*G*T*A*G*C (SEQ ID NO: 119)

FIGURA 9C

G*T*A*G*G*T*T*T*C*C*A*G*C*A (SEQ ID NO: 120)
T*T*C*A*A*T*C*C*A*A*G*G*A*A (SEQ ID NO: 121)
T*G*C*A*A*G*T*G*C*T*G*T*G*G*G*C (SEQ ID NO: 122)
G*T*A*C*C*C*A*C*T*G*T*T*G*G*T*G (SEQ ID NO: 123)
G*C*T*A*G*T*C*T*G*T*T*G (SEQ ID NO: 124)
A*G*G*A*C*C*C*T*T*C*T*T*C (SEQ ID NO: 125)
G*G*A*G*A*G*C*A*T*A*A*T*T*C (SEQ ID NO: 126)
T*A*G*A*A*G*T*C*T*G*G*A*G (SEQ ID NO: 127)
C*C*T*T*C*C*T*G*T*G*T*G*A*C*T*T (SEQ ID NO: 128)
T*T*T*T*C*T*C*T*A*G*T*T*T*C (SEQ ID NO: 129)
C*T*T*C*A*A*A*A*T*T*A*T*T (SEQ ID NO: 130)
A*C*T*T*T*C*A*A*T*A*C*T*T*C (SEQ ID NO: 131)
A*C*C*G*T*G*T*A*C*T*T*T*C*A (SEQ ID NO: 132)
C*A*C*C*C*T*G*C*C*C*C*A*G (SEQ ID NO: 133)
C*T*G*C*C*C*T*C*A*C*C*C*C (SEQ ID NO: 134)
C*T*G*A*G*G*A*A*G*G*A*G*C*A (SEQ ID NO: 135)
G*A*G*C*A*A*G*T*C*C*G*G*G*T (SEQ ID NO: 136)
A*G*C*T*G*T*C*A*C*T*G*A*C*A (SEQ ID NO: 137)
A*C*A*C*T*A*G*C*T*G*T*C*A*C*T*G*A*C*A (SEQ ID NO: 138)
C*A*C*A*C*T*A*G*C*T*G*T*C*A*C*T*G*A*C (SEQ ID NO: 139)
T*C*A*C*A*C*T*A*G*C*T*G*T*C*A*C*T*G*A (SEQ ID NO: 140)
A*C*T*C*A*C*A*C*T*A*G*C*T*G*T*C*A*C*T (SEQ ID NO: 141)
T*C*A*C*A*C*T*A*G*C*T*G*T*C*A (SEQ ID NO: 142)
G*T*A*C*T*C*A*C*A*C*T*A*G*C*T*G*T*C*A (SEQ ID NO: 143)
A*G*T*A*C*T*C*A*C*A*C*T*A*G*C*T*G*T*C (SEQ ID NO: 144)
A*G*A*G*T*A*C*T*C*A*C*A*C*T*A*G*C*T*G (SEQ ID NO: 145)
A*A*G*A*G*T*A*C*T*C*A*C*A*C*T*A*G*C*T (SEQ ID NO: 146)
T*A*A*G*A*G*T*A*C*T*C*A*C*A*C*T*A*G*C (SEQ ID NO: 147)
A*T*A*A*G*A*G*T*A*C*T*C*A*C*A*C*T*A*G (SEQ ID NO: 148)
A*G*T*A*C*T*C*A*C*A*C*T*A*G (SEQ ID NO: 149)
C*A*T*A*A*G*A*G*T*A*C*T*C*A*C*A*C*T*A (SEQ ID NO: 150)
A*C*A*T*A*A*G*A*G*T*A*C*T*C*A*C*A*C*T (SEQ ID NO: 151)
A*A*C*A*T*A*A*G*A*G*T*A*C*T*C*A*C*A*C (SEQ ID NO: 152)
G*A*A*C*A*T*A*A*G*A*G*T*A*C*T*C*A*C*A (SEQ ID NO: 153)
T*G*A*A*C*A*T*A*A*G*A*G*T*A*C*T*C*A*C (SEQ ID NO: 154)
C*T*G*A*A*C*A*T*A*A*G*A*G*T*A*C*T*C*A (SEQ ID NO: 155)
C*T*G*A*A*C*A*T*A*A*G*A*G*T (SEQ ID NO: 156)
A*A*A*G*T*C*A*A*G*A*G*G*T*A (SEQ ID NO: 157)
T*T*G*T*C*C*C*A*A*A*G*T*C (SEQ ID NO: 158)

FIGURA 9D

+A*A*+G*A*A*G*G*T*T*T*G*C*+C*+A*+T (SEQ ID NO: 159)
+T*+C*+A*C*A*C*T*A*G*C*T*G*+T*+C*+A (SEQ ID NO: 160)
A*A*G*A*A*G*G*T*T*T*G*C*C*A*T* (SEQ ID NO: 161)
T*C*A*C*A*C*T*A*G*C*T*G*T*C*A* (SEQ ID NO: 162)
CTCCTCCTGCCACTTCTTCTG (SEQ ID NO: 163)
CTGGTGGATGAAGAAGGTTTGC (SEQ ID NO: 164)
TTTGGATCTGGACGACTTC (SEQ ID NO: 165)
+C*+A*+A*T*A*A*G*T*A*G*C*C*+T*+G*+T (SEQ ID NO: 166)
+C*+A*+C*G*C*T*A*G*T*C*T*G*+T*+T*+G (SEQ ID NO: 167)
+C*+T*+T*C*C*T*T*C*C*T*G*T*+G*+T*+G (SEQ ID NO: 168)
+C*+A*+G*G*C*T*G*A*G*T*T*A*+C*+C*+G (SEQ ID NO: 169)
+G*+C*T* A*G*T* C*T*G* +T*+T*+G (SEQ ID NO: 170)
+G*+T*C* T*G*A* T*G*G* +A*+G*+A (SEQ ID NO: 171)
GCTAGT (SEQ ID NO: 172).
T*G*C* C*A*T* T*T*G* G*A*T* C*T*G* G*A*C* G (SEQ ID NO: 173)

FIGURA 10

FIGURA 11

```

                RH15      RH22
Humano  cagcttctcttgcaagctcgtgcagcttctggcgcgccctcttgagct
>>>>> ||| ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Rhesus  cagtttctcgtgcagctcgtgcagcttctggcgcgccctcgtggagct

                RH52      RH65      RH74      RH87
Humano  ctggcgcgagcggctccaccttctggcggtagagctccatctcctctgc
>>>>> | ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Rhesus  ccgcgcgagcggctccaccttctggcggtagagctccatctcctctgc

                RH116 RH118 RH121
                RH112 RH114 RH117 RH120 RH123
                RH113 RH115 RH119 RH122
Humano  cacttcttctggagctggcgaag
>>>>> ||||||| ||||||| |||||||
Rhesus  cacttcttctggagctgctccag

                RH130a
                RH125 RH126b RH128
                RH124 RH126a RH130h      RH139      RH151      RH169
Humano  atccaaatggcaaaccttctcgaaccaggacccaaccacaagctac
>>>>> ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Rhesus  atccaaatggcaaatcttctcgaaccaggacccaaccacaagctac

                RH126r RH130ra
                RH128 RH130rb
                RH178      RH183
Humano  ttattgctggaacctaagttgttctctggattgaaagtaatctctcctc
>>>>> ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Rhesus  ttattgctggaacctacctcattccttggattgaactaatcttctcctc

                RH233      RH247      RH264
Humano  ttctggtgcccacagcacttgccaacagtggttaccaacagacta
>>>>> ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Rhesus  ctctggtgtgcccacagcacttgccaacagtggttactcaacagacta

                RH285      RH321
Humano  gctgctctgcgaagaagggtcctctgacaatcaggggacaatgggaa
>>>>> || ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Rhesus  gcatgctgctgaagaagggtcctctgacaatcaggggacaatggggaa

                RH331      RH352
Humano  ttatgctctccagacttctatcacacacaagtcacacaggaaggaaggt
>>>>> ||||||| ||||||| || ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Rhesus  ttatgctctccagacttctatcacacaggaaggaaggt

                RH378      RH391      RH417
Humano  aagagaaactagagaaaataatttttgaagaaaacatttcaggaagtat
>>>>> ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

```

```

Rhesus aagagaaactagagaaaataatTTTTgaagaaaacatttcaagaagtat
                RH430                RH444                RH454
Humano  Tgaaagtacacggtaaactcagcctggggcaggggtggagggcagcagcac
>>>>> ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Rhesus  tgaaagtacacggtgacacaggtggggcaggggtggagggcagaagcac
                RH489                RH513
Humano  tgtttgctgcagctatgctccttctcagtgccctgcacacccgggactt
>>>>> ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Rhesus  tgtttgctgtagctgtgctccttctcagtgccctgcacacccgggactt
                RH556 RH558
                RH547 RH550 RH554 RH557 RH561
                RH543b RH545  RH549b RH553RH555b RH560
                RH543aRH544  RH549aRH552RH555a RH559  RH568
Humano  gctcaggtagcactctctctctcagggcagctaggtagggactcttat
>>>>> ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Rhesus  gctcagtgagcctctctcttctcagtgacagctagtgtgagtactcttat
                RH590                RH597
Humano  gttcagctgccctgactacctcttgacttgggggacaaattacttaac
>>>>> ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Rhesus  gttcagtgccactcaatacctcttgactttggggacaaattacttaac

```

FIGURA 11 (CONTINUACIÓN)